

# Die Rolle des Aquaporins CgPIP1;2

## in der C4-Photosynthese

von *Cleome gynandra*

VOM FACHBEREICH BIOLOGIE DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

zur  
Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
genehmigte  
Dissertation von

Dipl.-Biol. Henrik Tobias SPERLING

aus Erbach bei Ulm

1. Referent:

Prof. Dr. Gerhard THIEL

2. Referent:

Prof. Dr. Heribert WARZECHA

Tag der Einreichung:

26.03.2014

Tag der mündlichen Prüfung:

27.05.2014

Darmstadt, 2014

D17

# Für Heike

Eine neue wissenschaftliche Wahrheit pflegt sich nicht in der Weise durchzusetzen, dass ihre Gegner überzeugt werden und sich als belehrt erklären, sondern dadurch, dass die Gegner allmählich aussterben und dass die heranwachsende Generation von vornherein mit der Wahrheit vertraut gemacht ist.

*Max Planck*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Einführung</b>	<b>11</b>
2.1	C4-Photosynthese . . . . .	11
2.2	NAD-ME Typ der C4-Photosynthese . . . . .	13
2.3	Aquaporine . . . . .	15
2.4	Modellorganismen . . . . .	16
2.5	Ziele der Arbeit . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1	Kultivierung von <i>Cleome gynandra</i> . . . . .	20
3.2	Physiologische Charakterisierung von <i>Cleome gynandra</i> und <i>Cleome spi-</i> <i>nosa</i> mittels Gaswechselanalyse . . . . .	23
3.2.1	Veränderung der Assimilationsrate bei zunehmender Lichtintensität	24
3.2.2	Veränderung der Assimilationsrate bei Erhöhung der CO <sub>2</sub> -Konzentration im Außenmedium . . . . .	30
3.2.3	Zwischenergebnis . . . . .	33
3.3	Expressionslevel der Transkripte von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	34
3.3.1	Quantitativer Northern Blot . . . . .	34
3.3.2	Nukleotid-Sequenzähnlichkeit der Aquaporine . . . . .	35
3.3.3	Zwischenergebnis . . . . .	38
3.4	Analyse der Unterschiede in der Aminosäuresequenz . . . . .	38
3.4.1	Zwischenergebnis . . . . .	42
3.5	Funktionelle Analyse der Aquaporine . . . . .	42
3.5.1	Einfluss von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auf die Wasserleitfähigkeit . .	42
3.5.2	Einfluss von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auf die CO <sub>2</sub> -Leitfähigkeit . .	47
3.5.3	Zwischenergebnis . . . . .	52
3.6	Lokalisation von CgPIP1;2 mittels fluoreszierendem Fusionsprotein . . . .	52
3.6.1	Transfizierung von Zwiebschuppenzellen . . . . .	52
3.6.2	Zwischenergebnis . . . . .	53
3.7	“ <i>Virus Induced Gene Silencing</i> ” mit TRV . . . . .	53
3.7.1	Bioinformatische Arbeiten . . . . .	54
3.7.1.1	Erstellen eines Transkriptoms . . . . .	54
3.7.1.2	BlastX . . . . .	56
3.7.1.3	BlastN des Transkriptoms gegen AthPDS3 Sequenz . . . .	56
3.7.1.4	Isolation von Phytoendesaturase (PDS) Sequenzen . . . .	57

3.7.1.5	Quantifizierung PDS Sequenzen . . . . .	57
3.7.1.6	PDS Sequenz und ungewollte Nebenreaktionen . . . . .	59
3.7.1.7	Zwischenergebnis . . . . .	60
3.7.2	Klonierung von CgPDS und CsPDS . . . . .	60
3.7.3	VIGS Durchführung . . . . .	61
3.7.4	VIGS Nachweis . . . . .	63
3.7.5	Zwischenergebnis . . . . .	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
4.1	Kultivierung von <i>Cleome gynandra</i> . . . . .	66
4.2	Physiologische Charakterisierung von <i>Cleome gynandra</i> und <i>Cleome spi-</i> <i>nosa</i> mittels Gaswechselanalyse . . . . .	68
4.3	Expressionslevel der Transkripte von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	71
4.4	Analyse der Unterschiede in der Aminosäuresequenz . . . . .	72
4.5	Funktionelle Analyse der Aquaporine . . . . .	72
4.6	Lokalisation von CgPIP1;2 mittels fluoreszierendem Fusionsprotein . . . . .	74
4.7	“ <i>Virus Induced Gene Silencing</i> ” mit TRV . . . . .	76
4.8	Ausblick . . . . .	78
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>80</b>
5.1	Methoden mit Desoxyribonukleinsäure (DNS) . . . . .	80
5.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . . .	80
5.1.1.1	Standard PCR . . . . .	80
5.1.1.2	“Touch-down” PCR . . . . .	81
5.1.2	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	81
5.1.3	DNA Extraktion aus Agarosegelen . . . . .	82
5.1.4	Restriktionsabbau . . . . .	82
5.1.5	Ligation von DNA Fragmenten in Vektoren . . . . .	82
5.1.6	Klonierung mit dem Gateway-System von Invitrogen . . . . .	82
5.1.7	Sequenzierung . . . . .	83
5.2	Methoden mit Ribonukleinsäure (RNS) . . . . .	83
5.2.1	Isolation von Gesamt-RNS aus Pflanzen (LiCl-Methode) . . . . .	83
5.2.2	cDNS Synthese . . . . .	85
5.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNS . . . . .	85
5.2.4	Northern Blot . . . . .	86
5.2.4.1	Herstellung von Sonden . . . . .	87
5.2.4.2	Transfer der RNS auf eine Nylon-Membran . . . . .	87
5.2.4.3	Hybridisierung und Detektion . . . . .	88
5.3	Methoden mit <i>E. coli</i> . . . . .	90
5.3.1	Verwendete Stämme . . . . .	90
5.3.2	Anzucht . . . . .	90
5.3.3	Chemische Transformation . . . . .	91
5.3.3.1	Präparation kompetenter Zellen . . . . .	91
5.3.3.2	Transformation . . . . .	92

5.3.4	Plasmidisolation . . . . .	93
5.3.5	Kolonie-PCR . . . . .	94
5.3.6	TA-Klonierung und Blau-Weiß-Selektion . . . . .	94
5.3.7	Dauerkulturen . . . . .	94
5.4	Methoden mit <i>A. tumefaciens</i> . . . . .	95
5.4.1	Verwendete Stämme . . . . .	95
5.4.2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> . . . . .	95
5.4.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen . . . . .	95
5.4.4	Hitzeschocktransformation . . . . .	95
5.5	Methoden mit <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	96
5.5.1	Verwendete Stämme . . . . .	96
5.5.2	Anzucht von Hefen und Induktion der Genexpression . . . . .	96
5.5.3	Transfektion von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	98
5.5.3.1	Herstellung kompetenter Hefen . . . . .	98
5.5.3.2	Transfektion der Hefezellen . . . . .	99
5.5.4	Kolonie-PCR . . . . .	99
5.5.5	Dauerkulturen . . . . .	99
5.5.6	Stopped-Flow Spektrometrie . . . . .	99
5.5.6.1	Stopped-Flow Spektrophotometrie . . . . .	101
5.5.6.2	Osmotischer Permeabilitätskoeffizient ( $P_f$ ) der Plasma- membran der <i>S. cerevisiae</i> Protoplasten . . . . .	103
5.5.6.3	Stopped-Flow Spektrofluorometrie . . . . .	104
5.5.6.4	Stopped-Flow Spektrometrie Einstellungen . . . . .	106
5.6	Methoden mit Pflanzen . . . . .	106
5.6.1	Anzuchtbedingungen <i>Cleome gynandra</i> . . . . .	106
5.6.2	“Biolistic Transformation” . . . . .	107
5.6.2.1	“Microcarrier” Vorbereitung . . . . .	107
5.6.2.2	Beschichtung der “Microcarrier” mit DNS. . . . .	107
5.6.2.3	“Biolistic bombardment” . . . . .	107
5.6.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	107
5.6.4	Virus-induced-gene-silencing . . . . .	108
5.6.5	Isolation genomischer DNS aus Pflanzen . . . . .	109
5.6.6	Gaswechsellmessungen . . . . .	110
5.7	Bioinformatische Methoden . . . . .	113
5.7.0.1	Automatisierter BLAST . . . . .	115
5.7.0.2	Quantifizierung von der Transkripte . . . . .	116
5.7.0.3	Ausschluß ungewollter Nebenreaktionen . . . . .	116
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
	<b>Algorithmenverzeichnis</b>	<b>122</b>



# 1 Zusammenfassung

## Hintergrund

*Cleome gynandra* PIP1;2 (CgPIP1;2) ist ein Aquaporin unbekannter Funktion. Im Vergleich zu *Cleome spinosa* PIP1;2 (CsPIP1;2) ist die Expression nach Quantifizierung einer 454-Sequenzierung auf Transkriptebene 20-fach erhöht (Bräutigam et al. (2011)). Beide Pflanzen unterscheiden sich in ihrem Photosynthesetyp (Koteyeva et al. (2011); Marshall et al. (2007)). Die Aquaporine CgPIP1;2 und CsPIP1;2 sind bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz homolog zu *Arabidopsis thaliana* (AthPIP1;2) der eine Rolle in der "C3-Photosynthese" spielt.

## Zielsetzung

**Bestätigung der Annahmen zum Photosynthesetypen von *C. gynandra* und *C. spinosa*. Bestätigung der Unterschiedlichen Expression in beiden Pflanzenarten. Funktionsanalyse zu CgPIP1;2 und CsPIP1;2 im heterologen Expressionsmodell Hefe. Erste Lokalisationsstudien auf zellulärer Ebene. Etablierung einer bioinformatischen Datenpipeline zur Isolation von Sequenzen die in einem nachfolgenden viralen System (Virus induced Gene Silencing, "VIGS") zur gezielten Herabregulierung von Transkripten dienen sollen. Untersuchung der Verwendbarkeit des "Tobacco Rattle Virus" für das VIGS in *C. gynandra***

## Ergebnisse

- **Anzucht Cleome:**
  - Zur Gewinnung von Pflanzenmaterial wurden optimale Keimungsbedingungen (30 °C auf feuchtem Filterpapier) ermittelt.
  - Abweichend von Ekpong (2009) wurde keine Dormanz der Samen festgestellt.
  - Eine Keimung auf MS-Agar führte zu geringen Keimungsraten (2 % bzw. 4 %).
- **Physiologische Charakterisierung von *C. gynandra* und *C. spinosa*:**
  - *C. gynandra* zeigt im Vergleich zu *C. spinosa* bei höheren Lichtintensitäten signifikant höhere CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten bei einer ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentration (390 ppm). Die untersuchten *C. gynandra* und *C. spinosa* zeigen dabei keine signifikanten Unterschiede in Quantenausbeute und Elektronentransportrate.
  - *C. gynandra* zeigt im Vergleich zu *C. spinosa* bei konstanter Lichtintensität (1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen) und niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (70 und 375 ppm) signifikant höhere CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten.

- Der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt (CCP) ist signifikant niedriger bei den untersuchten *C. gynandra*.
  - *C. gynandra* und *C. spinosa* zeigen bei einer hohen CO<sub>2</sub>-Konzentration (750 ppm) und bei Veränderung der Lichtintensitäten keine signifikant unterschiedlichen CO<sub>2</sub>-Assimilationsraten.
- **Expressionslevel der Transkripte von CgPIP1;2 und CsPIP1;2:**
    - Ein quantitativer Northern Blot zeigte eine ca. 10-fach stärkeres Signal von CgPIP1;2 verglichen mit CsPIP1;2.
- **Analyse Aminosäuresequenzunterschiede von CgPIP1;2 und CsPIP1;2:**
    - Die Sequenzen von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 weisen eine 97,9 %-ige Identität in den 286 Aminosäuren auf (bei einem E-Wert von  $2.6 \cdot 10^{-184}$ ).
    - Die Sequenzunterschiede an Position 67, 69 und 183 befinden sich in Transmembranhelices und könnten eine Rolle bei der Tetramerisierung durch unterschiedliche räumliche Ausdehnung spielen.
    - *C. gynandra* besitzt mit S155 und S160 zwei polare und mit L161 eine unpolare Aminosäure. *C. spinosa* besitzt hingegen mit P155 und I160 zwei unpolare und mit Q161 eine polare Aminosäure.
- **Funktionelle Analyse von CgPIP1;2 und CsPIP1;2:**
    - CgPIP1;2 und CsPIP1;2 zeigen im Vergleich zu NtPIP2;1 eine qualitativ geringere Veränderung der Wasserleitfähigkeit in Hefeprotoplasten. NtPIP2;1 ist als wasserleitendes Aquaporin beschrieben. Beide *Cleome* Aquaporine zeigen ein Verhalten verglichen mit einer uninduzierten Kontrolle. Die nach der Methode von van Heeswijk und van Os (1986) bestimmten Werte für die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) sind hierbei signifikant geringer, verglichen mit der für NtPIP2;1.
    - CgPIP1;2 und CsPIP1;2 zeigen ein mit NtAQP1 vergleichbares Verhalten bei der Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Permeabilität von Hefemembranen. NtAQP1 ist als ein die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Membranen veränderndes Protein charakterisiert. Alle drei weisen hierbei einen signifikant höheren Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) (nach der Methode von Yang et al. (2000)) auf, verglichen mit einem Membranprotein, das keine entsprechende Funktionalität zeigt.
- **Lokalisation:**
    - Ein Fusionsprotein von CgPIP1;2 mit mGFP zeigt bei einer Transfizierung von Zwiebelchuppenzellen eine Lokalisation an den Zellwänden. Dies legt eine Lokalisation von CgPIP1;2 in der Plasmamembran der Zwiebelchuppenzellen nahe.

- **“Virus Induced Gene Silencing” (VIGS) mit TRV:**

- Mittels Bioinformatischer Datenpipelines wurden Rohdaten einer 454-Sequenzierung von cDNA von *Cleome* bearbeitet und die Sequenz der Phytoendesaturasen (CgPDS und CsPDS) aus den Datensätzen identifiziert und isoliert.
- Die Sequenzinformationen wurden für eine Klonierung von Teilsequenzen von CgPDS und CsPDS benutzt. Diese Sequenzen wurden in Vektoren für ein auf dem “Tobacco Rattle Virus” (TRV) beruhendes System (“VIGS”) kloniert.
- Der Nachweis von Transkripten des “Movement Protein” des TRV, in zur Kontrolle transfizierten *N. benthamiana*, konnte gezeigt werden. Das Vorliegen dieses Transkriptes stellte eine *conditio sine qua non* für das Funktionieren eines auf TRV basierenden VIGS dar. Ein Nachweis des gleichen Transkriptes in *C. gynandra* in verschiedenen Gewebeproben zeigte ein Ausbleiben der Infektion von *C. gynandra* durch den TRV.

## Schlussfolgerungen

- Die physiologischen Reaktionen von *C. gynandra* und *C. spinosa* auf unterschiedliche Lichtintensitäten sowie auf unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen bestätigt die morphologische und biochemische Einordnung der beiden Pflanzen.

Merkmale wie

- die relativ höhere Assimilationsrate von *C. gynandra* bei höheren Lichtintensitäten und konstanter, ambienster CO<sub>2</sub>-Konzentration (390 ppm),
- die relativ höhere Assimilationsrate von *C. gynandra* bei konstanter, hoher Lichtintensität und niedriger CO<sub>2</sub>-Konzentration (im Bereich von 70 und 375 ppm) ebenso wie der signifikant niedrigere CCP, sowie
- Vergleichbare Assimilationsraten bei hoher CO<sub>2</sub>-Konzentration (750 ppm) von *C. gynandra* und *C. spinosa*

sprechen für eine Einordnung von *C. gynandra* als C4-Pflanze und *C. spinosa* als C3-Pflanze.

- Es konnte bestätigt werden, dass die Expression des Aquaporins CgPIP1;2 verglichen mit CsPIP1;2 in 8 Wochen alten Pflanzen um das 10-fache erhöht ist.
- Funktionelle Tests im heterologen Expressionsmodell Hefe zeigten, im Vergleich zu NtPIP2;1, keine Funktionalität von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 bezüglich einer Wasserleitfähigkeit der Aquaporine.
- Funktionelle Tests im heterologen Expressionsmodell Hefe zeigten eine Funktionalität von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 vergleichbar mit NtAQP1. Damit liegt eine Rolle der *Cleome* Aquaporine in der Photosynthese nahe.
- Die unterschiedlich starke Expression, sowie die Funktionalität der Aquaporine bezüglich CO<sub>2</sub> legt eine besondere Rolle von CgPIP1;2 bei der C4-Photosynthese nahe.

- Die mögliche Lokalisation in der Plasmamembran von Pflanzenzellen von CgPIP1;2 legt eine Rolle des Aquaporins bei der primären Fixierung des CO<sub>2</sub> durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) nahe. Die Verringerung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Mesophyllzellen könnte einer optimalen primären Fixierung dienen.
- Durch die Anwendung bioinformatischer Methoden können “Next Generation Sequencing” (NGS) Daten analysiert und zur Lösung spezifischer Probleme genutzt werden. Hierdurch können auch beim Nichtvorliegen genomischer Daten ein Transkriptom erstellt und Sequenzen von Interesse identifiziert und quantifiziert werden.
- Die Verwendbarkeit des TRV bei einem VIGS-Experiment mit *C. gynandra* ist durch das Fehlen einer Ausbreitung der Viren in diesen Pflanzen ausgeschlossen. Funktionale Tests in *C. gynandra* durch eine Herabregulierung spezifischer Transkripte müssen durch andere Viren-Systeme erfolgen.



## 2 Einführung

### 2.1 C4-Photosynthese

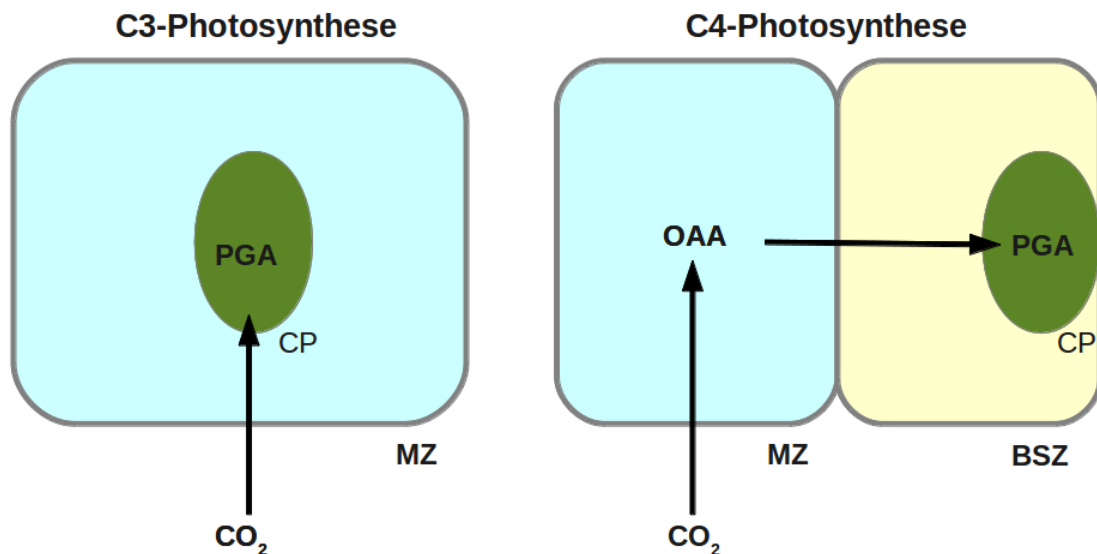
Die Photosynthese dient der Erzeugung komplexer organischer Moleküle aus Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) mittels Sonnenlicht. Ohne sie gäbe es weder elementaren Sauerstoff noch organische Verbindungen, die als Energiequelle oder molekulare Bausteine dienen können. Erst diese Stoffe ermöglichen in ausreichender Menge den Großteil des Lebens auf der Erde. den Großteil des Lebens zu ermöglichen.

Bei der Photosynthese wird die Energie des Lichtes an den Thylakoidmembranen der Chloroplasten genutzt, um in einer ersten Reaktion (Hill-Reaktion) Elektronen auf entsprechende Akzeptoren zu übertragen. Dabei werden Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) gewonnen. In einer zweiten Reaktion im Stroma der Chloroplasten (Calvin-Zyklus) wird  $\text{CO}_2$  mittels der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) als 3-Phosphoglycerat (PGA) zu fixiert. Dieses Enzym besitzt hierbei eine Affinität sowohl für  $\text{CO}_2$  als auch für  $\text{O}_2$ . Hierdurch kann es bei einem ungünstigen Konzentrationsverhältnis zur Photorespiration kommen. Hierbei wird  $\text{CO}_2$  produziert statt fixiert zu werden. Die in der Hill-Reaktion gewonnenen Reduktionselemente und ATP werden verwendet, um den im Calvinzyklus entstehenden C3-Körper weiter zu reduzieren und zum Teil als Akzeptor für eine erneute Fixierung von  $\text{CO}_2$  zu regenerieren.

Diese primäre Fixierung des  $\text{CO}_2$  in einem C3-Körper wird als C3-Photosynthese bezeichnet. Daneben besteht ein weiterer Grundtyp, der der C4-Photosynthese. Hierbei ist der Fixierung durch Rubisco eine Fixierung durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) vorgeschaltet. Diese erzeugt mittels Phosphoenolpyruvat (PEP) einen C4-Körper, das Oxalacetat (eng.: Oxaloacetic acid, OAA). Diese Unterscheidung, ob es sich bei dem ersten Fixierungsprodukt, um einen C3- oder C4-Körper handelt, ist somit namensgebend für die C3- bzw. C4-Photosynthese.

Ein grundsätzliches Merkmal der C4-Photosynthese ist die zweimalige Fixierung des  $\text{CO}_2$ , das zumeist über eine Kompartimentalisierung realisiert wird. Bis auf Ausnahmen werden die Fixierungsschritte in Mesophyllzellen und Bündelscheidenzellen aufgetrennt (Beispiel für eine C4-Photosynthese in einer Zelle in Voznesenskaya et al. (2001)). Die primäre Fixierung erfolgt in den Mesophyllzellen. Hierbei wird der Kohlenstoff des  $\text{CO}_2$  aus der Luft in der Form von OAA fixiert und nachfolgend in Aspartat oder Malat umgewandelt. Dieses diffundiert durch die zahlreichen Plasmodesmata in die Bündelscheidenzellen. Dort erfolgt eine Decarboxylierung und das frei werdende  $\text{CO}_2$  wird dann

durch den Calvinzyklus in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen wiederum fixiert (vergleiche Abbildung 2.1), um dann zur Synthese von Zuckern, Aminosäuren etc. zu dienen.

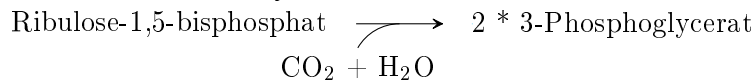
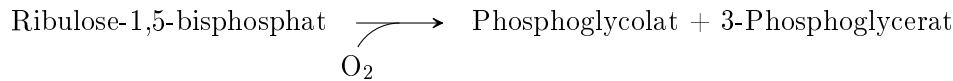


**Abbildung (2.1) Vergleich C3- und C4-Photosynthese**

Dargestellt ist ein vereinfachter Vergleich C3- und C4-Photosynthese. Bei der C3-Photosynthese gelangt  $\text{CO}_2$  in die Chloroplasten (CP) der Mesophyllzellen (MZ). Der Kohlenstoff wird durch Rubisco und den Calvinzyklus in 3-Phosphoglycerat (PGA) fixiert. In der C4-Photosynthese gelangt  $\text{CO}_2$  in die MZ und der Kohlenstoff wird dort in Form von Oxalacetat (OAA) fixiert. Nach weiteren Umwandlungsschritten gelangt der Kohlenstoff in den zentripetal (zum Leitbündel) angeordneten CP der Bündelscheidenzellen (BSZ) um dort durch Rubisco fixiert und im Calvinzyklus zu PGA umgewandelt zu werden.

Worin liegt der evolutionäre Vorteil einer solchen Anpassung?

Bei Trockenstress versucht die Pflanze, durch das Schließen der Stomata, ihre Transpiration zu reduzieren und damit den weiteren Wasserverlust zu vermindern. Hierbei steigt die Konzentration von  $\text{O}_2$  in den Zellen, da der Sauerstoff nicht mehr durch die Stomata entweichen kann. Gleichzeitig wird das im Blatt vorhandene  $\text{CO}_2$  durch Rubisco weiter fixiert, so dass die Konzentration von  $\text{CO}_2$  sinkt. Durch diese beiden Effekte kommt es zunehmend zur Fixierung von  $\text{O}_2$  durch die Rubisco. Statt der Bildung zweier Moleküle 3-Phosphoglycerat (bei der Carboxylasereaktion) entsteht durch die Oxygenasereaktion Phosphoglycolat sowie 3-Phosphoglycerat.

**Rubisco-Carboxylaseaktivität:****Rubisco-Oxygenaseaktivität:**

Die Folgeprodukte des Phosphoglycolat müssen hierbei mittels verschiedene Reaktionen in den Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien unter Freiwerden von  $\text{CO}_2$  wieder zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt werden. Da hierbei  $\text{O}_2$  verbraucht und  $\text{CO}_2$  hergestellt wird, spricht man von Photorespiration.

Bei der C4-Photosynthese liegen verschiedene Fixierungsschritte in verschiedenen Zelltypen und Kompartimenten vor (vergleiche Abbildung 2.2 auf Seite 15). Die erste Fixierung erfolgt durch die ( $\text{O}_2$ -unreaktive) PEPC in den Mesophyllzellen. Die zweite Fixierung erfolgt in den Bündelscheidenzellen durch die Rubisco, die sowohl eine  $\text{CO}_2$  als auch eine  $\text{O}_2$  Affinität besitzt. Die Aktivität des Photosystem II ( $\text{PS}_{\text{II}}$ ) und damit die Produktion von  $\text{O}_2$  in den Bündelscheidenzellen kann zwischen den C4 Typen stark variieren (Sage et al. (1999) S. 177). Wobei stark reduzierte Granae in den Chloroplasten auf ein hohes Verhältnis von  $\text{PS}_{\text{I}}$  zu  $\text{PS}_{\text{II}}$  hindeutet (Muhaidat et al. (2007)).

Durch die räumliche Trennung der Fixierung durch PEPC und Rubisco wird die Rubisco-Oxygenaseaktivität unterdrückt. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen ist dann auch bei Trockenstress hoch genug ist, um die Carboxylaseaktivität der Rubisco zu begünstigen. Dies wird auch dadurch erreicht, dass in den Chloroplasten der Mesophyllzellen - in denen die PEPC aktiv ist - keine Fixierung durch den Calvin-Zyklus mangels Rubisco erfolgt.

Die Vorteile für die C4-Pflanzen sind hierbei eine höhere Wassernutzungseffizienz, eine höhere Stickstoffnutzungseffizienz und schnellerer Aufbau von Biomasse (Sommer et al. (2012)). Die C3-Photosynthese ist hingegen bei geringen Lichtintensitäten photosynthetisch aktiver Strahlung im Vorteil. Bei geringen Lichtintensitäten tritt auch Photorespiration seltener auf. Daneben muss keine Energie für eine Vorfixierung von  $\text{CO}_2$  sowie der Ausbildung einer Kranz-Anatomie aufgewandt werden.

## 2.2 NAD-ME Typ der C4-Photosynthese

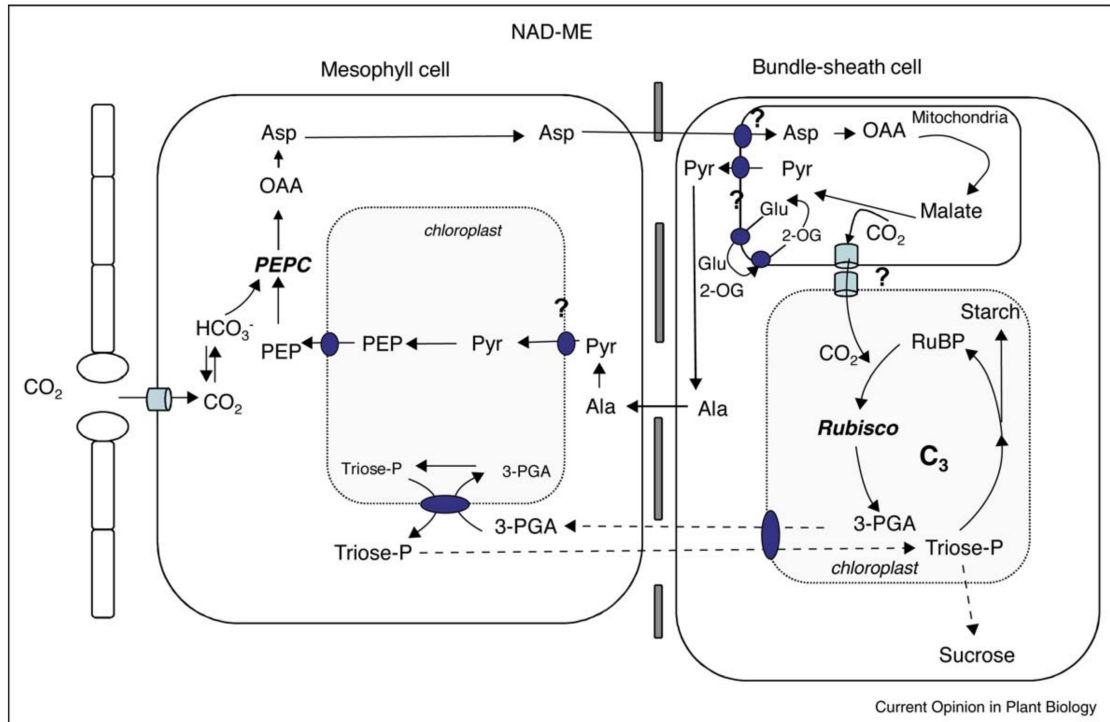
Die C4-Photosynthese wird - abhängig vom decarboxylierenden Enzym - in verschiedene Untertypen eingeteilt. Dieses decarboxylierende Enzym setzt den durch die erste  $\text{CO}_2$ -Fixierung entstandenen C4-Körper um. Hierbei wird  $\text{CO}_2$  wieder freigesetzt, um dann durch die Rubisco wiederum assimiliert zu werden.

Die decarboxylierenden Enzyme (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK), NAD-abhängige Malatenzym (eng.: "mitochondriale NAD-malic enzyme", NAD-ME), NADP-abhängige Malatenzym (NADP-ME)) sind zugleich namensgebend für den Untertyp der

C4-Photosynthese. So gibt es den PEP-CK- (z.B.: *Panicum maximum*, Watanabe et al. (1984)), den NADP-ME- (z.B.: *Zea mays*, Romanowska und Drozak (2006)) und den NAD-ME-Typ (z.B.: *Panicum miliaceum*, Sommer et al. (2012), *Cleome gynandra*, Marshall et al. (2007)) der C4-Photosynthese. Der Übergang zwischen den Typen der C4-Photosynthese ist zum Teil fließend. Die C4-Photosynthese kann sich mit Blattalter und Aussetzung von Licht entwickeln (Bassi und Passera (1982)).

Im Folgenden soll die C4-Photosynthese des NAD-ME Typs (dargestellt in Abbildung 2.2 (auf der nächsten Seite)) detailliert besprochen werden. Das in der Luft enthaltene  $\text{CO}_2$  gelangt durch die Stomata in die Interzellularen. Es diffundiert durch die Zellwand und Plasmamembran in das Cytosol der Mesophyllzellen und wird zu Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) umgesetzt. Die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) setzt das  $\text{HCO}_3^-$  mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Oxalessigsäure (OAA) - dem ersten C4-Körper - um. Dieses wird mittels Glutamat durch die Aspartat Aminotransferase (AspAT) in Aspartat (Asp) umgewandelt. Das Asp diffundiert - wahrscheinlich entlang eines steilen Konzentrationsgradienten - durch die Plasmodesmata bis in die Mitochondrien der Bündelscheidenzellen. Dort erfolgt eine Umwandlung durch die mitochondriale AspAT zu OAA. Dieses wird durch die mitochondriale Malat Dehydrogenase zu Malat reduziert. Das Malat wird mittels  $\text{NAD}^+$  durch das für den Typ namensgebende NAD-abhängige Malatenzym (NAD-ME) zu Pyruvat,  $\text{CO}_2$  und NADH umgesetzt. Das Pyruvat wird aus den Mitochondrien transportiert und durch die cytosolische Alanin-Aminotransferase (AlaAT) in den Bündelscheidenzellen zu Alanin (Ala) umgesetzt. Das Ala gelangt durch die Plasmodesmata in die Mesophyllzellen, wird durch die AlaAT der Mesophyllzellen deaminiert und zu Pyruvat umgesetzt und in den Chloroplasten zu PEP recycelt. Nach dem Ausschleusen aus dem Chloroplasten der Mesophyllzellen steht das PEP als Akzeptor für das  $\text{HCO}_3^-$  wiederum bereit.

Das durch die Decarboxylierung und durch Atmung in den Mitochondrien entstandene  $\text{CO}_2$  gelangt über die Membranen der Mitochondrien zum Ort der Fixierung durch die Rubisco in den Chloroplasten. Hierbei muss das  $\text{CO}_2$  wiederum die Membranen der Chloroplasten überwinden. Es ist unklar, ob dies durch passive Diffusion oder Proteinvermittelt geschieht (Weber und von Caemmerer (2010)).



**Abbildung (2.2) NAD-ME Typ der C4-Photosynthese**

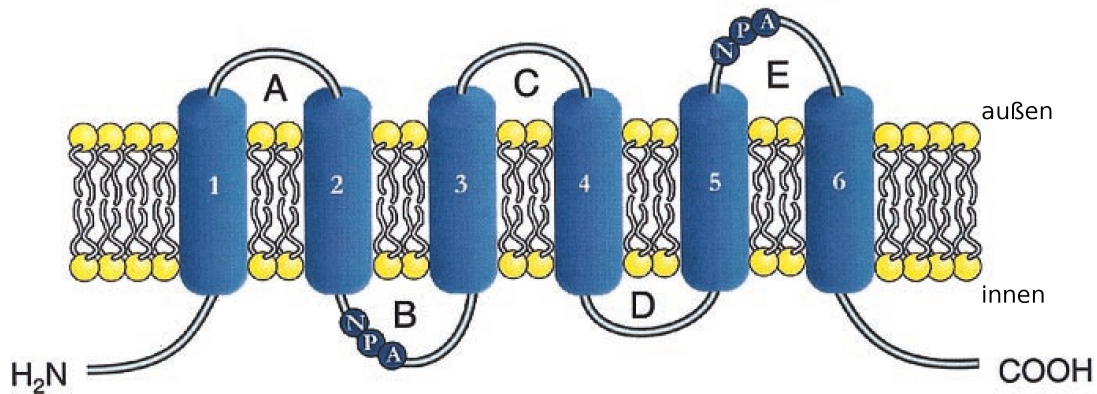
Modell der NAD-ME C4-Photosynthese nach Weber und von Caemmerer (2010), wie er für *Panicum miliaceum* postuliert wird.

Im Vergleich dazu ist der Pfad des CO<sub>2</sub> zum Verbraucher (Rubisco) in der C<sub>3</sub>-Photosynthese vom Cytosol in die Chloroplasten (dargestellt in Evans et al. (2009)) von weniger Umwandlungen und Transportschritten geprägt. Da die C<sub>4</sub>-Photosynthese auf Enzymen im Cytosol, Chloroplasten und Mitochondrium beruht, muss der Kohlenstoff des CO<sub>2</sub> aus der Luft über mehrere Membranen bis zu seinem Endverbraucher, der Rubisco gelangen. Während ein Teil der Literatur davon ausgeht, dass das CO<sub>2</sub> hierbei direkt über die Membranen diffundiert (Missner et al. (2008)), gehen andere davon aus, dass die Diffusion über die Membran durch Membranproteine erleichtert wird (Evans et al. (2009)). Die Leitfähigkeit der Membran für CO<sub>2</sub> soll hierbei durch Aquaporine verändert werden.

## 2.3 Aquaporine

Aquaporine sind Membranproteine, bestehend aus sechs Transmembranhelices. Jeweils drei extrazelluläre (A, C, E) und zwei extrazelluläre Schleifen (B, D) verbinden die Helices und bilden eine Tonnenstruktur mit einem Kanal zwischen den Helices. Das Asparagin, Prolin, Alanin (NPA) Motiv in Schleife B und E ist dabei in die Tonnenstruktur gefaltet und Teil des Selektivitätsmechanismus. Durch diesen Kanal können kleine Moleküle wie das namensgebende H<sub>2</sub>O oder auch z.B. NH<sub>3</sub> (Bertl und Kaldenhoff (2007)) diffundieren.

Die Aquaporine bilden Tetramere, wodurch eine zentrale Pore zwischen den Aquaporinen entsteht (Yool und Weinstein (2002), Kruse et al. (2006)). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob durch diese zentrale Pore oder durch den Kanal des einzelnen Aquaporins  $\text{CO}_2$  diffundiert (Endeward et al. (2006)). Die Struktur der Aquaporine ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt.



**Abbildung (2.3) Schematische Darstellung der Aquaporinsekundärstruktur**

Die Transmembranhelices sind beginnend vom N-Terminus durchnummeriert (1-6). Die extrazellulären Schleifen (A, C, E) sowie die intrazellulären Schleifen (B, D), das Asparagin, Prolin, Alanin (NPA) Motiv sowie der N- und C-Terminus sind gekennzeichnet. Das Zellinnere und äußere ist jeweils beschriftet. Die Abbildung wurde von Siefritz et al. (2001) übernommen und angepasst.

Die Aquaporine der Pflanzen werden in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Aufteilung in PIP (eng.: plasma-membrane intrinsic protein), TIP (eng.: tonoplast intrinsic protein), NIP (NOD26-like intrinsic protein), und SIP (small basic intrinsic protein) wird beschrieben in Kruse et al. (2006). Ähnlichkeiten der Proteinsequenzen führt hierbei zu dieser phylogenetischen Einteilung.

## 2.4 Modellorganismen

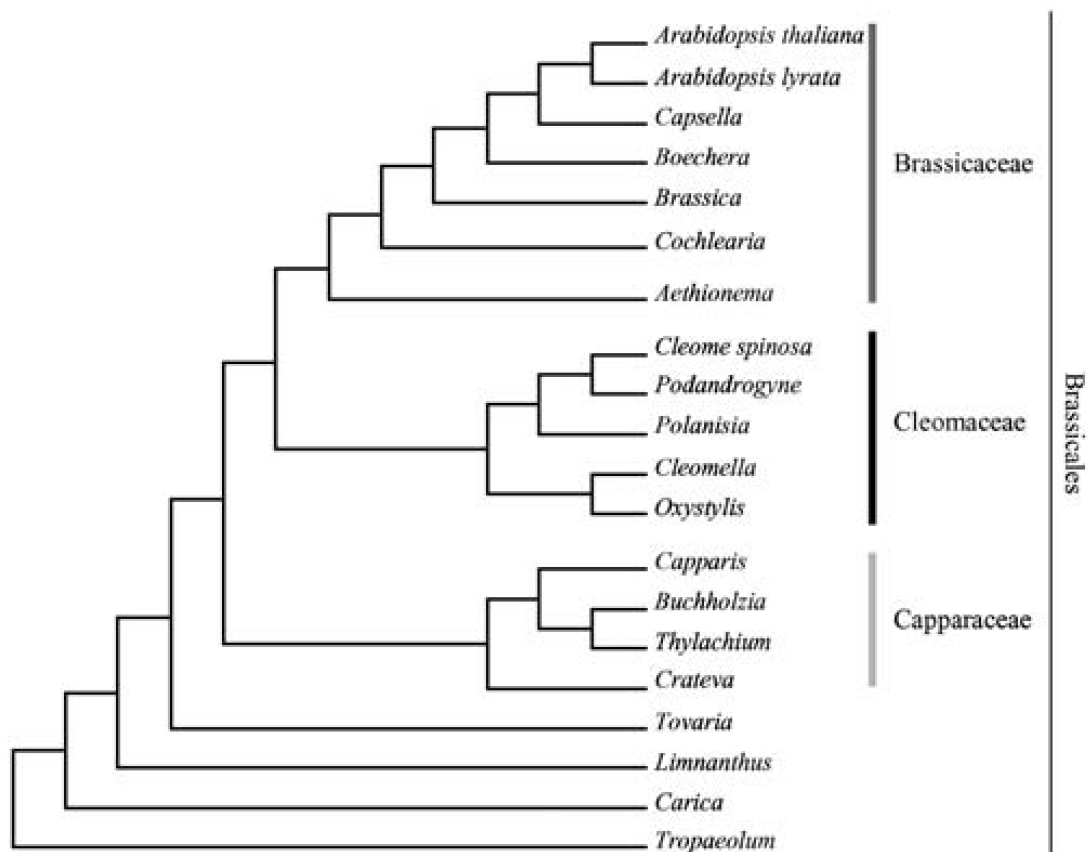
Es stellt sich die Frage ob und welche Rolle Aquaporine in der  $\text{C}_4$ -Photosynthese spielen. Vorteilhaft zur Klärung dieser Frage wäre eine vergleichende Untersuchung von eng verwandten Pflanzen, die jeweils die  $\text{C}_3$ - und  $\text{C}_4$ -Photosynthese verwenden. Notwendig wäre also ein Modellorganismus, der innerhalb einer Gattung Pflanzenarten mit sowohl  $\text{C}_3$ - als auch  $\text{C}_4$ -Photosynthese besitzt. Durch die enge Verwandtschaft sollten Unterschiede in Biochemie und Physiologie auf ein Minimum beschränkt werden. Idealerweise würde für beide Arten ein vollständig sequenziertes Genom vorliegen oder es gäbe einen Modellorganismus mit vollständig sequenziertem Genom der in naher Verwandtschaft steht.



**Abbildung (2.4)**  
***C. gynandra* und**  
***C. spinosa***

Bilder von *C. gynandra*  
(links) und *C. spinosa*  
(rechts). Quelle:  
commons.wikimedia.org

Die Gattung *Cleome* besitzt Pflanzenarten mit beiden Photosynthesetypen im Genus. Als C4-Vertreter dient die aus Afrika stammende *C. gynandra*. Als Pflanze mit C3-Photosynthese dient die aus Südamerika stammende *C. spinosa* (siehe Marshall et al. (2007)). Genomische Daten beider *Cleome* waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht erhältlich. Die Pflanzen sind aber als Teil der Ordnung der Brassicales (siehe Abbildung 2.5 (auf der nächsten Seite)) nahe verwandt mit dem sehr gut beschriebenen Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), deren genomische Daten vorliegen.



**Abbildung (2.5) Stammbaum der Ordnung der Brassicales**

Phylogenetische Beziehung der Brassicaceae, Cleomaceae und weiterer Gattungen nach Schranz und Mitchell-Olds (2006).

Da das Genom zwischen *Arabidopsis* und *Cleome* nach Schranz und Mitchell-Olds (2006) eine signifikante Syntenie zeigen, waren diese Pflanzen geeignet, um Fragestellungen der C4-Photosynthese im Verhältnis zur C4-Photosynthese zu bearbeiten.

## 2.5 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Rolle die das Aquaporin CgPIP1;2 in der Photosynthese von *C. gynandra* spielt. Hierzu mussten diverse Einzelfragen geklärt werden. Diese stellten zum Teil eine Bestätigung anderer Ergebnisse mit anderen experimentellen Mitteln und Methoden dar. Da es sich bei *Cleome gynandra* und der im Vergleich betrachteten *Cleome spinosa* um nicht sehr ausführlich beschriebene Organismen handelt, mussten diverse Fragestellungen und Probleme behandelt werden die sich bei der Arbeit mit anderen Modellorganismen nicht mehr stellen. Im Gegensatz zu gut beschriebenen



Modellorganismen wie zum Beispiel *A. thaliana* oder *Zea mays* gab es keine frei zugänglichen genomischen sowie kaum physiologische und biochemische Daten. Weiterhin fehlten robuste Protokolle im Umgang mit den Pflanzen wie dies für einen verbreiteten Modellorganismus selbstverständlich ist.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit geklärt werden:

- Vorbedingung für Untersuchungen und der Gewinnung von Pflanzenmaterial war die Kultivierung der *Cleome*. Insbesondere die Keimung von *C. gynandra* sowie die Anzuchtbedingungen wurden überprüft.
- Mittels Gaswechsellanalytik sollten die *Cleome* verglichen werden um hieraus auf den jeweiligen Photosynthesetypen der Pflanzen zu schließen. Insbesondere wurde die experimentelle Gestaltung auf das Verhalten einer C3- bzw. C4-Pflanze bei einer Veränderung von Messlichtintensität und CO<sub>2</sub>-Konzentration im Außenmedium abgestimmt. Hierdurch sollten Kenngrößen der Photosynthesysteme festgestellt werden. Weiterhin sollte die Reaktion der Photosynthesysteme unter Bedingungen getestet werden die zu einer Klassifizierung als C3- und C4-Photosynthese dienen können.
- Es sollte bestätigt werden, dass die Transkription der Aquaporine CgPIP1;2 und CsPIP1;2 in den Blättern beider Pflanzenarten unterschiedlich ist.
- Die Aquaporine sollten auf Ebene der Aminosäuresequenz miteinander verglichen werden, um festzustellen ob es sich um homologe Proteine handelt und ob mögliche Unterschiede in Funktion, Lokalisation etc. ihren Ursprung in der Aminosäuresequenz haben können.
- Die Funktion der Aquaporine sollte im heterologen Expressionsmodell Hefe überprüft werden um eine mögliche Rolle in der Photosynthese zu bestätigen.
- Die Lokalisation der Aquaporine ist eng mit ihrer physiologischen Rolle verknüpft. Es sollten erste Lokalisationsstudien durchgeführt werden um die Funktion eingrenzen zu können.
- Um funktionelle Studien in den Pflanzen selber durchführen zu können sollte die Machbarkeit des “Virus induced gene silencing” (VIGS) mittels des “Tobacco Rattle Virus” in *Cleome* überprüft werden. Als Vorbedingung hierfür sollte mittels bioinformatischer Methoden aus 454-Sequenzierungsdaten die kodierende Sequenz für die native Phytoendesaturase isoliert werden. Die Sequenzen dienen dann als eine Kontrolle für das Funktionieren des VIGS Experimentes neben dem Nachweis eines für die Infektion notwendigen Virenproteins in infizierten Pflanzen.

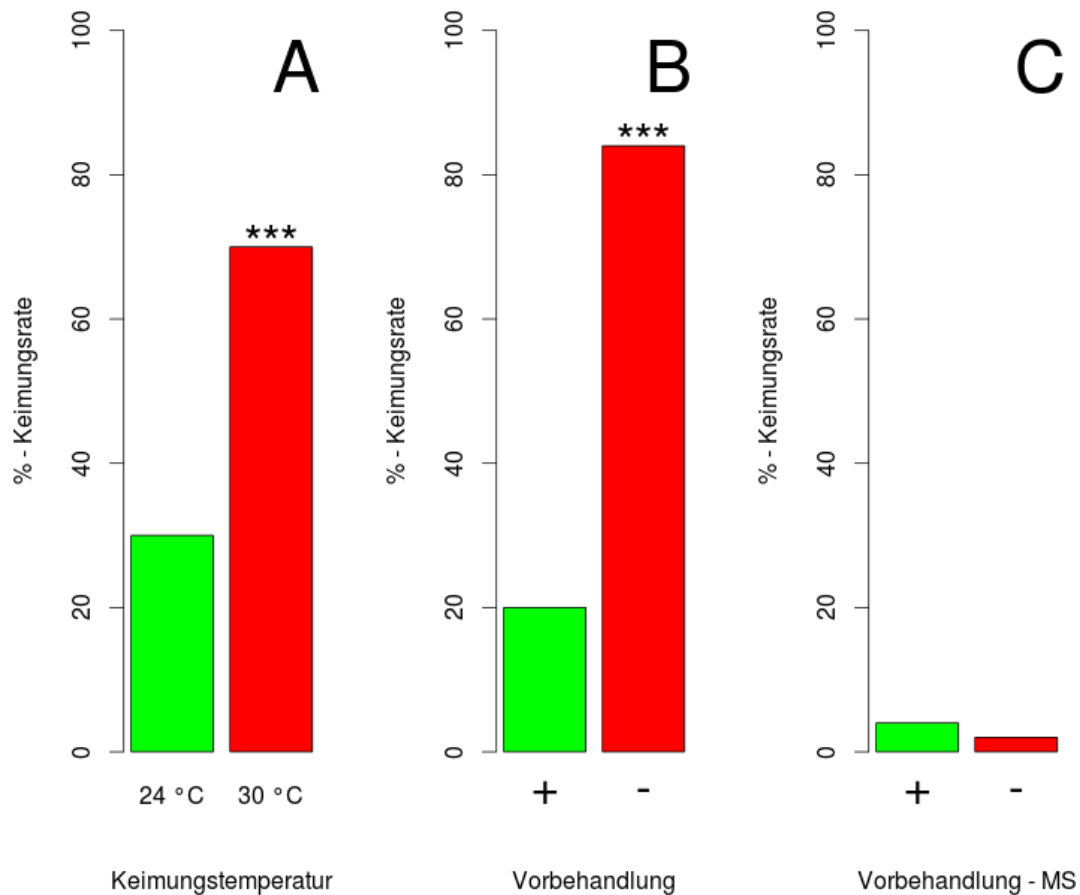
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kultivierung von *Cleome gynandra*

Um die Rolle aufzuklären, die Aquaporine in der C4-Photosynthese spielen, sollten die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zur C3-Photosynthese untersucht werden. Hierfür ist ein Pflanzenmodell notwendig, dass innerhalb nah verwandter Arten sowohl C3- als auch C4-Photosynthese besitzt. Durch eine nahe Verwandtschaft wurden die physiologischen und genetischen Unterschiede minimiert. Als Modell für diese Untersuchung diente die Gattung *Cleome*. Diese besitzt die C3- und C4-Photosynthese innerhalb derselben Gattung (Koteyeva et al. (2011); Marshall et al. (2007)) und ist als Teil der Ordnung *Brassicales* nahe mit der vollständig sequenzierten und gut beschriebenen *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalband) verwandt.

Die Kultivierung der Pflanzen war die Vorbedingung für Folgeexperimente mit den Pflanzen. Da die *C. gynandra* anfänglich nur sehr schwierig kultiviert werden konnten, wurden verschiedene Keimungsbedingungen getestet. Um die Keimungsbedingungen zu testen, wurden jeweils 50 Samen für 4 Tage unter verschiedenen Bedingungen im Dunkeln gekeimt. Als erstes wurden verschiedene Keimungstemperaturen getestet. Eine Keimung der Samen bei 24 °C erfolgte zu 30 %, wohingegen bei 30 °C eine Keimungsrate von 70 % vorlag. Für alle Folgeexperimente wurden nun die Temperatur von 30 °C gewählt. Nach Ekpong (2009) sollte eine Vorbehandlung (Inkubation der Samen für 5 Tage bei 40 °C) zu einer Erhöhung der Keimungsrate führen. Eine solche Vorbehandlung führte zu einer Keimungsrate von 20 %, wohingegen die unbehandelten Samen eine Keimungsrate von 84 % aufwiesen (jeweils auf feuchtem Whatman-Papier). Parallel wurde überprüft ob eine Keimung auch auf Murashige-Skoog-Medium mit Agar (MS-Agar) möglich ist. Hierzu wurden Hitze-behandelte und unbehandelte Samen auf entsprechende Petrischalen mit MS-Agar ausgebracht. Dies führte zu einer Keimungsrate von 4 % bei den vorbehandelten, bzw. von 2 % bei den unbehandelten Samen.

Für alle weiteren Kultivierungsschritte wurde die Samen ohne Vorbehandlung bei 30 °C auf feuchtem Whatman-Papier für zwei Tage zum Keimen gebracht und danach auf MS-Agar oder Erde umgesetzt.



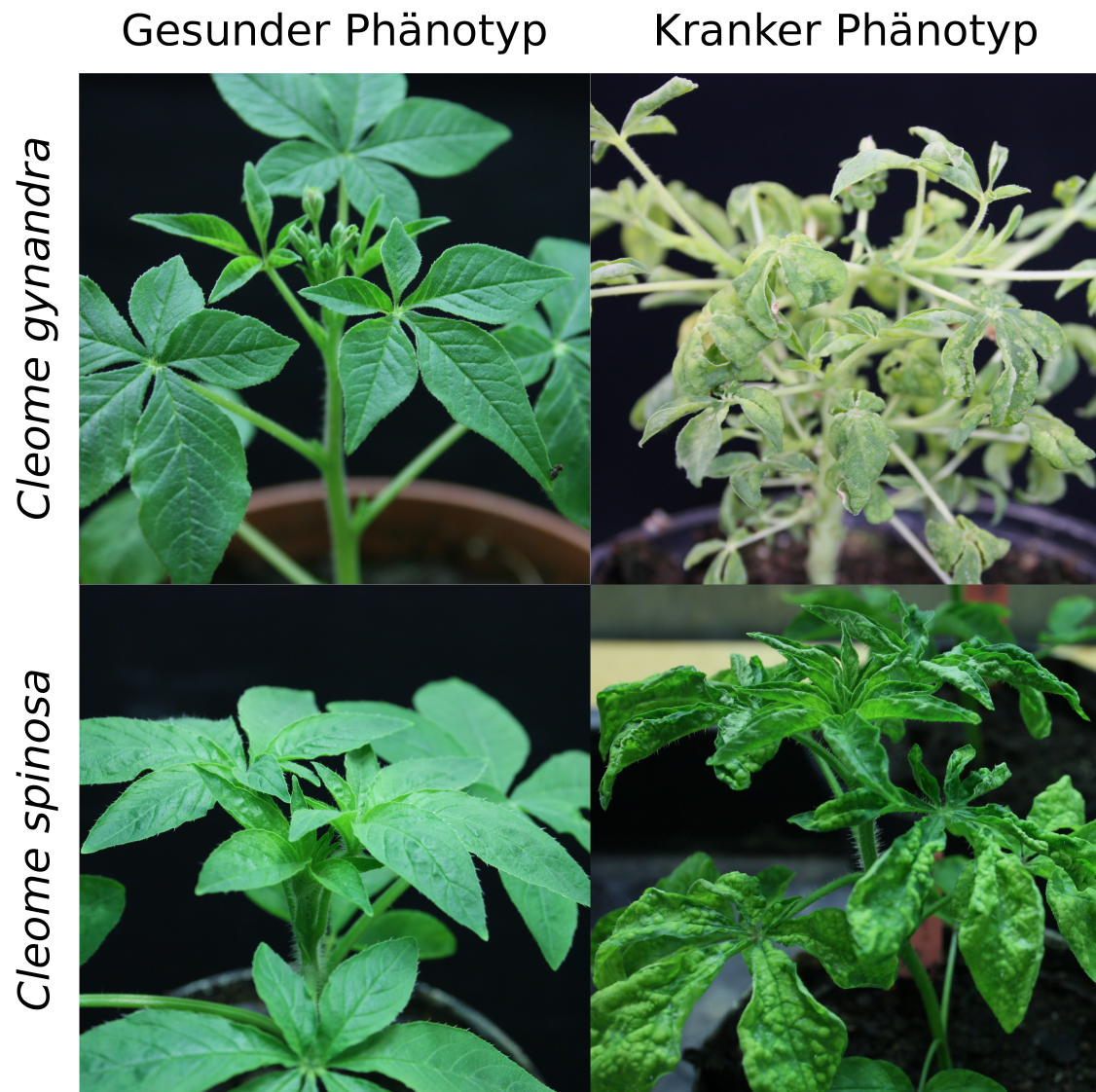
**Abbildung (3.1) Keimungsverhalten von *C. gynandra***

Die Keimungsrate von *C. gynandra* wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet. In Abbildung (A) ist die Variation der Keimungstemperatur bei 24 °C und 30 °C auf feuchtem Whatman-Papier zu sehen. Abbildung (B) zeigt die Keimungsrate bei erfolgter (+) und unterbliebener (-) Vorbehandlung bei 40 °C für 5 Tage und anschließender Keimung auf feuchtem Whatman-Papier. In (C) ist die Keimungsrate bei erfolgter (+) und unterbliebener (-) Vorbehandlung bei 40 °C für 5 Tage und anschließender Keimung auf MS-Agar zu sehen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels Z-Statistik mit Yates-Korrektur bestimmt (\*\*\*) :=  $p < 0,001$ ), jeweils  $n = 50$ .

Bei der Kultivierung von *C. gynandra* und *C. spinosa* traten Phänotypen auf, die sich durch gekräuselte und blasse Blätter von den anderen Pflanzen unterschieden. Hierbei waren zumeist ca. 95 % der Pflanzen betroffen. Es wurde überprüft, ob die Anzuchtbedingungen für diesen Phänotyp ausschlaggebend sind. Durch die Variation verschiedenster Parameter, wie dem Substrat, der Lufttemperatur, der Dauer und Strahlungsintensität des Anzuchtlichtes, wurde überprüft, ob diese für den Phänotypen verantwortlich sind. Da der Phänotyp aber hiervon völlig unabhängig auftrat, lag der Verdacht einer Viru-

serkrankung nahe. Viren wie “Ageratum enation Virus” (Raj et al. (2010)) oder “Cleome leaf crumble virus” (CLCrV) (da Silva et al. (2011)) können den beobachteten Phänotyp auslösen. Der in den Anzuchtkammer auftretende Befall durch Schadinsekten legte nahe, dass Ausgangspunkt (einer möglichen Infektion) das verwendete Saatgut war. Der Virus wurde dann wohl durch die Schadinsekten auf noch unbefallene Pflanzen übertragen. Als Lösung für dieses Problem wurde das gesamte Saatgut durch neues ersetzt und Pflanzen nur noch in eigenen Anzuchtkammern aufgezogen, die zuvor desinfiziert und gründlichst gereinigt worden war. Letztendlich wurden als Anzuchtbedingungen eine Photoperiode von 16 h ( $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 24 °C, relative Luftfeuchte 65 %) sowie einer Dunkelperiode von 8 h ( $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PFD, 20 °C, relative Luftfeuchte 65 %) gewählt. Ein weiterer Befall trat nach diesen Maßnahmen nicht mehr auf. Ob es sich um einen Virenbefall handelte wurde im Sinne eines Ziel-orientierten Arbeitens nicht überprüft.

Nachdem nun Pflanzen vorlagen, konnten diese für Folgeexperimente eingesetzt werden.



**Abbildung (3.2) Krankhafter Phänotyp bei *C. gynandra* und *C. spinosa***  
 Beobachteter Phänotyp nach 12 Wochen Kultivierung im Gewächshaus (*C. gynandra* links unten *C. spinosa* links oben). Im Vergleich ein unveränderter Phänotyp unter gleichen Bedingungen angezogen (jeweils rechts). Eine Veränderung von Luftfeuchte, Temperatur, Lichteinfall und Substrat führte zu keiner Veränderung des Auftretens des Phänotyps innerhalb der verschiedenen Parameter.

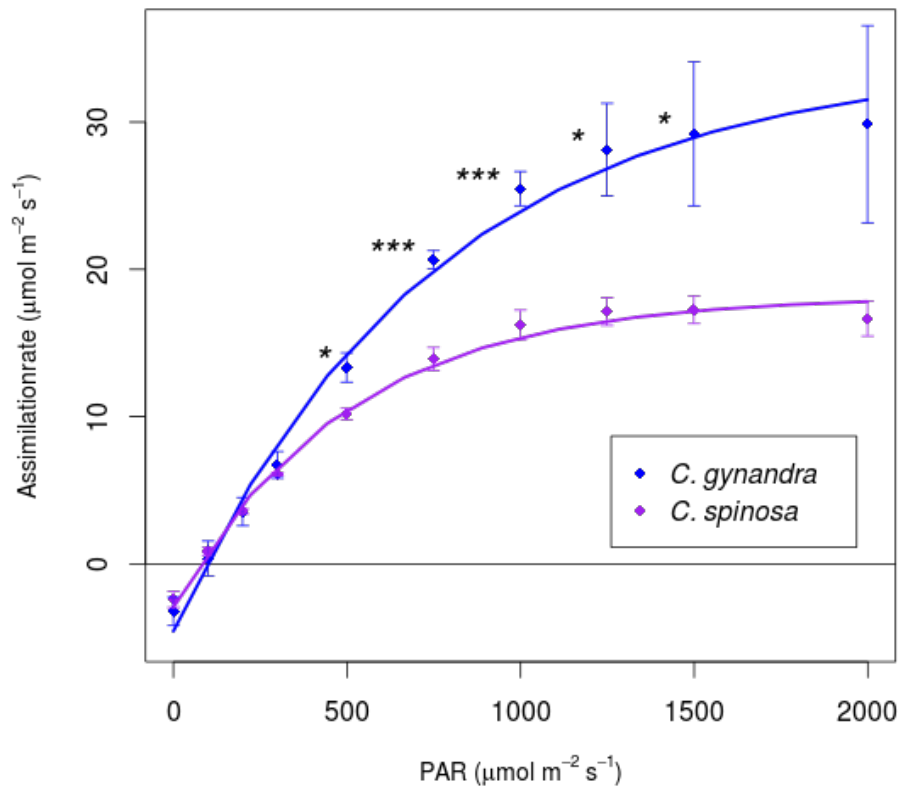
### 3.2 Physiologische Charakterisierung von *Cleome gynandra* und *Cleome spinosa* mittels Gaswechselanalyse

Eine Charakterisierung der *Cleome* erfolgte bisher über histologische und biochemische Methoden (Bräutigam et al. (2011); Marshall et al. (2007)). Die Gaswechselanalyse ge-

zeigt von Marshall et al. (2007) beschränkte sich auf zwei Parameter, wobei nur minimale Informationen über die entsprechende Analyse geliefert wurde. Darauf aufbauend, soll in dieser Arbeit eine detaillierte Gaswechselanalyse vorgenommen werden die über die Nennung zweier Kennwerte hinaus geht. Um die Charakterisierung der *Cleome* als C4- und C3-Pflanze zu bestätigen, sollte mittels Gaswechselanalytik die entsprechenden Eigenschaften der beiden Pflanzen im Vergleich zueinander bestimmt werden. Insbesondere sollten die Reaktion der Pflanzen auf unterschiedliche Lichtintensitäten und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Außenmedium hin untersucht werden. Weiterhin soll ein experimenteller Aufbau gezeigt werden, der durch die Reaktion der Pflanzen auf verschiedene experimentelle Bedingungen, einen weitergehenden Beleg für die Art der Photosynthese liefert. Eine C4-Pflanze sollte bei hohen Lichtintensitäten in normaler Luft höhere Assimilationsraten aufweisen und später in eine Sättigung der Assimilationsrate übergehen als eine C3-Pflanze. Weiterhin zeigt sich eine inhibitorische Wirkung höherer Lichteinstrahlungen bei einer C3-Pflanze früher als bei einer C4-Pflanze. Hierbei kommt es zu einem Abfall der Assimilationsrate bei sehr hohen Lichteinstrahlungen. Eine weitere Unterscheidung ist der Licht-Kompensationspunkt. Dieser ist der Bereich von Lichteinstrahlung bei dem die Menge des durch Atmung produzierte CO<sub>2</sub> der Menge an durch Photosynthese produziertem CO<sub>2</sub> entspricht. Dieser Punkt ist bei C3-Pflanzen niedriger als bei C4-Pflanzen, da erstere im Vergleich besser an Standorte mit niedriger Lichteinstrahlung angepasst sind. Weiterhin sollte der CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt (eng.: CO<sub>2</sub> compensation point, CCP) bestimmt werden, also die CO<sub>2</sub>-Konzentration bei dem das durch Atmung erzeugte CO<sub>2</sub> dem durch die Assimilation verbrauchten CO<sub>2</sub> entspricht. Auch dieser wäre bei einer C4-Pflanze verglichen mit einer C3-Pflanze geringer.

### 3.2.1 Veränderung der Assimilationsrate bei zunehmender Lichtintensität

Es wurde mittels Gaswechselmessung die Abhängigkeit der Netto-Assimilationsrate ( $A_N$ ) von ansteigender Lichtintensität photosynthetisch wirksame Strahlung (eng.: Photosynthetically Active Radiation, PAR) ermittelt. Hierzu wurden jeweils 3 Pflanzen von *C. gynandra* und *C. spinosa* (28 Tage alt) als Versuchsobjekt verwendet. Eine Auftragung der Daten ist in Abbildung 3.3 (auf der folgenden Seite) zu sehen.



**Abbildung (3.3) Lichtkurve von *C. gynandra* und *C. spinosa***

Die Netto-Assimilationsrate aufgetragen gegen PAR bei ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (390 ppm) von *C. gynandra* und *C. spinosa*. Aufgetragen sind die Mittelwerte von jeweils drei 28 Tage alten Pflanzen mit Standardabweichung. Eine Signifikanzberechnung der A<sub>N</sub>-Unterschiede wurde, nach Überprüfung der Normalverteilung, mit einem two-tailed t-Test durchgeführt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Die Werte der korrespondierenden Punkte von A<sub>N</sub> zwischen 500 und 1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> von *C. gynandra* und *C. spinosa* unterscheiden sich bei einem t-Test signifikant voneinander. Die A<sub>N</sub> der wahrscheinlichen C4-Pflanze *C. gynandra* ist also bei hohen Lichtintensitäten signifikant höher als die der wahrscheinlichen C3-Pflanze.

Es wurde mit dem Programm R mit der Mitscherlich-Gleichung (Algorithmus 1 (auf der nächsten Seite)) eine Kurvenanpassung vorgenommen. Die Mitscherlich-Gleichung

(nach Potvin und Lechowicz (1990)) beschreibt die Antwort der Pflanze auf Düngung und wird entsprechend bei atmosphärischem CO<sub>2</sub> angewandt. Über die Kurvenanpassung wurden die Parameter der Gleichung bestimmt. Es wurde die maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate ( $A_{\max}$ ) bestimmt. Dieser ist der Maximalwert der Photosyntheserate den die Pflanze bei Lichtbedingungen einnimmt, die den Photosyntheseapparat maximal auslasten. Weiterhin wurde der lineare Anstieg, der die schnelle Reaktion von  $A_N$  bei niedrigen PAR wiedergibt ( $A_{qe}$ ), bestimmt. Dieser ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit der Pflanze bei geringen Lichtintensitäten. Als letzter Punkt wurde der Lichtkompensationspunkt (LCP) bestimmt. Also der Lichtstrom, bei dem das durch die Assimilation verbrauchte CO<sub>2</sub> dem durch die Atmung produzierten CO<sub>2</sub> entspricht. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

$$A_N = A_{max} * \left(1 - e^{-A_{qe} * (PPF - LCP)}\right)$$

#### Algorithmus (1) Mitscherlich Gleichung

Gleichung zur Anpassung an ökophysiologische Antwortkurven. Hierbei wird angepasst an die vorliegenden Gaswechseldaten. Dabei wurde die lichtgesättigte maximale Assimilationsrate ( $A_{\max}$ ), der lineare Anstieg der die schnelle Reaktion der Netto Assimilationsrate ( $A_N$ ) bei niedrigen PAR wiedergibt ( $A_{qe}$ ) sowie der Lichtkompensationspunkt (LCP) ermittelt. Sowohl  $A_N$  als auch der photosynthetischer Photonenfluss (PPF) sind aus den Datensätzen gegeben.

Die  $A_{\max}$  der C3-Pflanze beträgt nur 53,2 % der C4-Pflanze bei ambientem CO<sub>2</sub> (390 ppm). Der  $A_{qe}$  der C3-Pflanze beträgt 151 % verglichen mit der C4-Pflanze. Der LCP von *C. spinosa* ist mit 74,38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  geringer als der von *C. gynandra* mit 93,72  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Eine statistische Signifikanz der Unterschiede konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Pflanze	$A_{\max} \pm \text{SD}$	$A_{qe} \pm \text{SD}$	LCP $\pm \text{SD}$
<i>C. gynandra</i>	34,19 $\pm$ 1,94	1,33e-3 $\pm$ 0,17e-3	93,72 $\pm$ 15,84
<i>C. spinosa</i>	18,19 $\pm$ 0,60	2,01e-3 $\pm$ 0,19e-3	74,38 $\pm$ 11,01

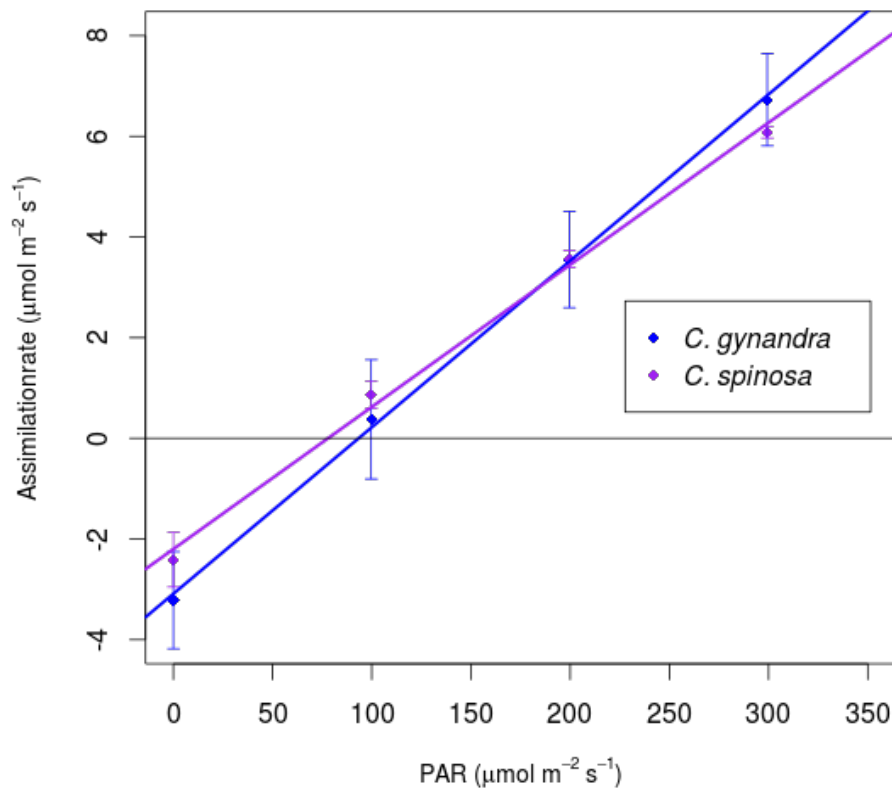
**Tabelle (3.1) Parameter der Lichtkurve**

Mittels Kurvenanpassung der Lichtkurve (Abbildung 3.3 (auf der vorigen Seite)) mit Algorithmus 1 ermittelte Werte. Lichtgesättigte Assimilationsrate ( $A_{\max}$ ), der lineare Anstieg der die schnelle Reaktion von  $A_N$  bei niedrigen PAR wiedergibt ( $A_{qe}$ ) und Lichtkompensationspunkt (LCP) bei ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (390 ppm) und 25 °C. Zu den Mittelwerten ( $n = 3$ ) ist jeweils die Standardabweichung (SD) angegeben.

Alle Werte aus Tabelle 3.1 sprechen im direkten Vergleich für eine C4-Photosynthese von *C. gynandra* und eine C3-Photosynthese von *C. spinosa*. In Abbildung 3.4 (auf der folgenden Seite) sind die Daten aus Abbildung 3.3 (auf der vorigen Seite) in einer Vergrößerung (bei niedriger PAR) zu sehen. Mittels einer Regressionsgeraden an den Werten zwischen 0 und 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde der Schnittpunkt mit der X-Achse (dies entspricht dem Lichtkompensationspunkt) bestimmt. Es zeigte sich, dass der so bestimmte Licht-



kompensationspunkt der vermessenen *C. spinosa* bei  $73,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  beträgt. Bei den verwendeten *C. gynandra* zeigte sich der Lichtkompensationspunkt bei  $91,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Insoweit ist der so ermittelte LCP mit den Werten aus Tabelle 3.1 (auf der vorhergehenden Seite) vergleichbar.

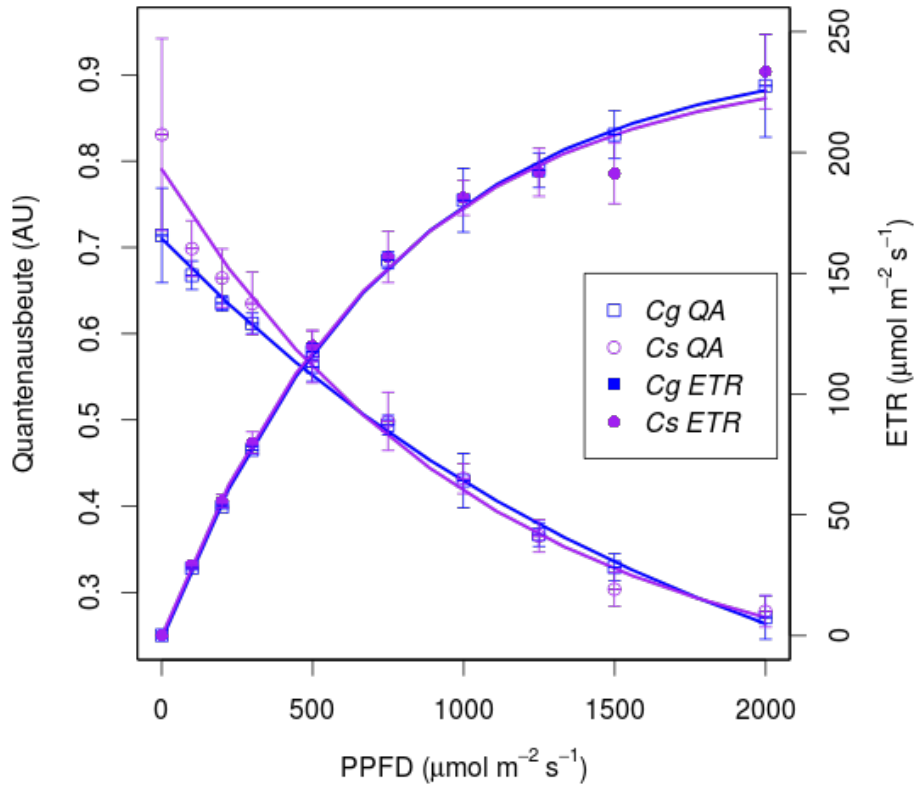


**Abbildung (3.4)** Lichtkurve *C. gynandra* und *C. spinosa* 0 -  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Der Bereich von 0 bis  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen wurde vergrößert, um den Bereich bei dem die Netto Assimilationsrate Null beträgt zu zeigen. Zusätzlich wurden lineare Anpassungen für die ersten vier Messpunkte eingezeichnet, um den Lichtkompensationspunkt (Schnittpunkt mit der X-Achse) bestimmen zu können.

Es musste ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der Lichtkurve auf ein unter-

schiedliches Verhalten des Photosystems und damit der Elektronentransportrate (ETR) der beiden Pflanzenarten zurückzuführen ist. Hierfür wurde parallel zur obigen Messung auch die Fluoreszenz als Reaktion auf das eingestrahlte Licht des Pflanzenmaterials bestimmt und darüber die Quantenausbeute und die ETR bestimmt. Die Quantenausbeute beschreibt hierbei das Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen. Diese wird aus den Fluoreszenzwerten berechnet. Die Elektronentransportrate des Photosyntheseapparates wird aus der Quantenausbeute und der PAR ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 (auf der nächsten Seite) dargestellt. Die Werte von Quantenausbeute und ETR unterscheiden sich nicht signifikant in einem t-Test.

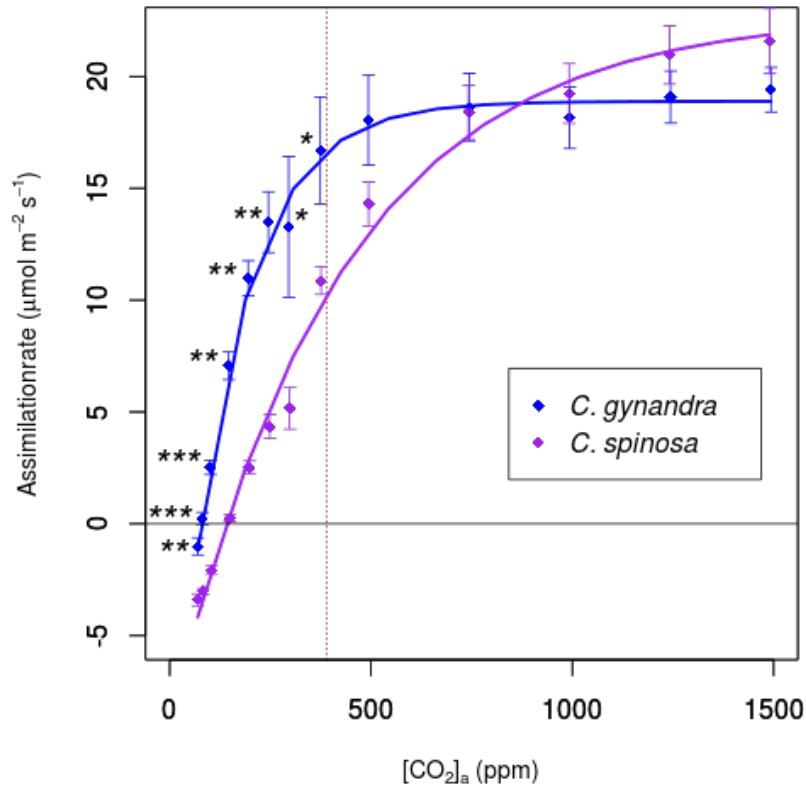


**Abbildung (3.5) Quantenausbeute und Elektronentransportrate**

Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Pflanzen von *C. gynandra* und *C. spinosa* mit Standardabweichung. Quantenausbeute (**linke Y-Achse**) aufgetragen gegen PAR, Mittelwerte mit Standardabweichung von *C. gynandra* (**Cg QA**) und *C. spinosa* (**Cs QA**). Die ETR (**rechte Y-Achse**) aufgetragen gegen PAR, Mittelwerte mit Standardabweichung von *C. gynandra* (**Cg ETR**) und *C. spinosa* (**Cs ETR**). Es wurden keine signifikanten Unterschiede von Quantenausbeute und ETR zwischen den Pflanzen in einem two-tailed t-Test festgestellt.

### 3.2.2 Veränderung der Assimilationsrate bei Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Außenmedium

Um die Reaktion der Pflanzen auf eine Veränderung der CO<sub>2</sub>-Konzentration unter licht-sättigenden Bedingungen ( $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen) zu testen, wurde die Konzentration des CO<sub>2</sub> in der Messküvette variiert. Auf diese Weise sollte die Auswirkung einer sich verändernden CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Assimilationsrate beobachtet werden. Um die C3- und C4-Pflanzen vergleichen zu können, wurde die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Außenmedium ( $C_a$ ) als Messgröße verwendet. Die Auftragung der Daten ist in Abbildung 3.6 (auf der folgenden Seite) zu sehen. Bei *C. gynandra* tritt bei ca. 500 ppm eine Sättigung der Assimilationsrate ein. Bei *C. spinosa* tritt eine Sättigung frühestens bei ca. 1250 ppm ein. Beide Pflanzen haben bei 750 ppm eine vergleichbare Assimilationsrate. Zwischen 70 und 390 ppm zeigt die *C. gynandra* eine statistisch signifikante Erhöhung von  $A_N$ . Diese spricht für das Vorliegen einer C4-Photosynthese bei dieser Pflanzenart im Vergleich mit der C3-Pflanze *C. spinosa*. Ein Fit der Kurven mit einer angepassten Mitscherlich-Gleichung (Algorithmus 2 auf Seite 32) ergab die in Tabelle 3.2 auf Seite 32 aufgeführten Werte. Bei der Erstellung der Kurvenanpassung wurden jeweils die Werte jedes der drei Messungen berücksichtigt.



**Abbildung (3.6) Veränderung der Assimilationsrate (A) von *C. gynandra* und *C. spinosa* bei Veränderung der CO<sub>2</sub>-Konzentration**

Veränderung der Assimilationsrate (A) bei Veränderung der CO<sub>2</sub> Konzentration außerhalb des Blattes (C<sub>a</sub>) und konstanter Photonenstromdichte (1500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD). Die ambiente CO<sub>2</sub> Konzentration (390 ppm) wurde als rot gestrichelte Linie eingezeichnet. Signifikante Unterschiede wurde nach einem two-tailed t-Test in der Grafik markiert (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

$$A_N = A_{max} * \left(1 - e^{-A_{qe} * (PPF - CCP)}\right)$$

### Algorithmus (2) Angepasste Mitscherlich Gleichung

Gleichung zur Anpassung an ökophysiologische Antwortkurven. Hierbei wird durch Anpassung an die Gaswechseldaten die lichtgesättigte maximale Assimilationsrate ( $A_{max}$ ), der lineare Anstieg der die schnelle Reaktion der Netto Assimilationsrate ( $A_N$ ) bei niedrigen PAR wiedergibt ( $A_{qe}$ ) sowie der  $CO_2$ -Kompensationspunkt (CCP) ermittelt. Sowohl  $A_N$  als auch der photosynthetischer Photonenfluss (PPF) sind aus den Datensätzen gegeben.

Hierbei zeigt sich, dass  $A_{max}$  (die maximale Assimilationsrate) und  $A_{qe}$  (Steigung der linearisierten Mitscherlich-Gleichung, welche die Rate wiedergibt die die Erhöhung der Photosynthese mit Erhöhung der  $CO_2$  Konzentration entspricht) nicht statistisch signifikant unterschiedlich waren. Der  $CO_2$ -Kompensationspunkt (CCP) zeigt hingegen einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ). Der CCP beschreibt die  $CO_2$ -Konzentration im Außenmedium bei der die Assimilationsrate null beträgt. Der CCP beträgt bei *C. spinosa* das 1,8-fache des von *C. gynandra*. Letztere kann somit bereits bei niedrigen  $CO_2$ -Konzentration im Außenmedium  $CO_2$ -Assimilation bei hohen Lichtintensitäten betreiben. Der Unterschied im CCP spricht für eine Charakterisierung von *C. gynandra* als C4-Pflanze.

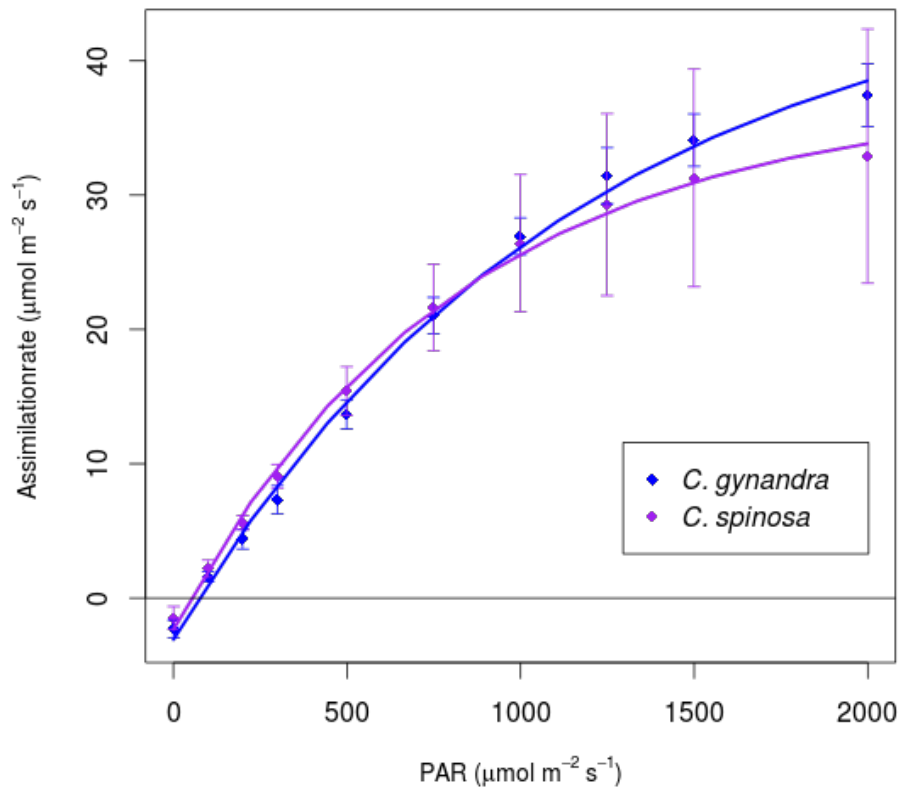
Pflanze	$A_{max} \pm SD$	$A_{qe} \pm SD$	CCP $\pm SD$
<i>C. gynandra</i>	18,91 $\pm$ 0,53	7,27e-3 $\pm$ 0,76e-3	78,53 $\pm$ 5,04 ***
<i>C. spinosa</i>	21,89 $\pm$ 0,75	2,48e-3 $\pm$ 0,68e-3	138,63 $\pm$ 5,86

### Tabelle (3.2) Parameter der Kurvenanpassung mit der Mitscherlich Gleichung

Die Auswertung der Auftragung (Veränderung der Assimilationsrate bei Veränderung der  $CO_2$ -Konzentration) ergab die gesättigte Rate der  $CO_2$  Aufnahme ( $A_{max}$ ).  $A_{qe}$  steht für die Steigung der linearisierten Mitscherlich-Gleichung. Diese gibt die Rate wieder die der Erhöhung der Photosynthese mit Erhöhung der  $CO_2$  Konzentration entspricht. Der Schnittpunkt mit der X-Achse gibt den  $CO_2$ -Kompensationspunkt (CCP) bei einem sättigenden Lichteinstrom ( $1500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$  Photonen) wieder. Statistische Signifikanz nach two-tailed t-Test (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

Um die Effekte einer hohen  $CO_2$ -Konzentration im Außenmedium auf beide Arten zu untersuchen, wurde ein weiterer Messaufbau gewählt. Entsprechend der Lichtkurve mit 390 ppm  $CO_2$  (Abbildung 3.3 auf Seite 25) wurde die Assimilationsrate bei sich verändernden Lichtintensitäten gemessen. Allerdings wurde nun die dem Blatt zur Verfügung stehende  $CO_2$ -Konzentration im Außenmedium auf 750 ppm eingestellt. Beide Pflanzen zeigten nun ein vergleichbares Verhalten. Wobei *C. spinosa* nun eine mit *C. gynandra* vergleichbare Netto-Assimilationsrate aufwies (Abbildung 3.7 (auf der folgenden Seite)). Bei *C. gynandra* kommt es, verglichen mit ambienten  $CO_2$ -Konzentrationen, jedoch zu einer vergleichbar geringeren Erhöhung in der Netto-Assimilationsrate. Der Vorteil des Aufkonzentrierungsmechanismus, den eine C4-Photosynthese gegenüber einer C3-Photosynthese bei niedrigen  $CO_2$ -Konzentrationen aufweist, wird bei hohen  $CO_2$ -Konzentrationen im Außenmedium nivelliert. Bei einer Signifikanzberechnung mit dem two-tailed t-Test wa-

ren zwischen den Pflanzen keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die Nullhypothese, dass die beiden Pflanzen bei der vorliegenden Behandlung nicht unterschiedlich sind, wurde somit nicht widerlegt.



**Abbildung (3.7) Lichtkurve von *C. gynandra* und *C. spinosa* bei 750 ppm CO<sub>2</sub>**

Dargestellt ist die Auftragung der Assimilationsrate gegen PAR bei 750 ppm CO<sub>2</sub> im Außenmedium. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Assimilationsrate zwischen den Pflanzen in einem two-tailed t-Test festgestellt.

### 3.2.3 Zwischenergebnis

Die Gaswechseldaten von *C. gynandra* zeigen im Vergleich zu denen von *C. spinosa* ein Verhalten, das man von einer C4-Pflanze verglichen mit einer C3-Pflanze erwarten wür-

de. Die vorliegende Gaswechselanalytik bestätigt insoweit Ergebnisse in der Literatur (Bräutigam et al. (2011); Marshall et al. (2007)). Die *C. gynandra* weist höhere Assimilationsraten bei höheren Messlichtintensitäten auf. Eine Sättigung der Assimilationsrate konnte im Gegensatz zu *C. spinosa* nicht beobachtet werden. Der höhere Lichtkompensationspunkt sowie der niedrigere CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt sind ebenfalls Belege für ein C4-Photosynthese typisches Verhalten von *C. gynandra*. Das beide Pflanzen bei 750 ppm CO<sub>2</sub> und ansteigenden Lichtintensitäten ein ähnliches Verhalten zeigen, ist ein Beleg dafür, dass ein Vorteil von *C. gynandra* bei der Assimilation von CO<sub>2</sub> nur bei niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen gegeben ist.

Die beobachteten Unterschiede sind auf unterschiedlichen Photosynthesetypen der Pflanzen zurückzuführen welche neben morphologischen Unterschieden auf einer anderen Enzymausstattung der Pflanzen beruht. Weiterhin ist bedingt durch die morphologischen Unterschiede ein Unterschied in der Ausstattung mit Membranproteinen sehr wahrscheinlich. Die NADP-ME-C4-Photosynthese beruht in einem System aus Mesophyll- und Bündelscheidenzellen darauf, dass Kohlenstoffkörper die verschiedenen Membranen der beiden Zellen und ihrer Organellen überqueren müssen. Hierbei können im Falle des CO<sub>2</sub> Aquaporine eine Rolle spielen. Da geklärt werden soll, ob Aquaporine eine spezielle Rolle in der C4-Photosynthese spielen, muss deren Expression in beiden Pflanzen vergleichend untersucht werden.

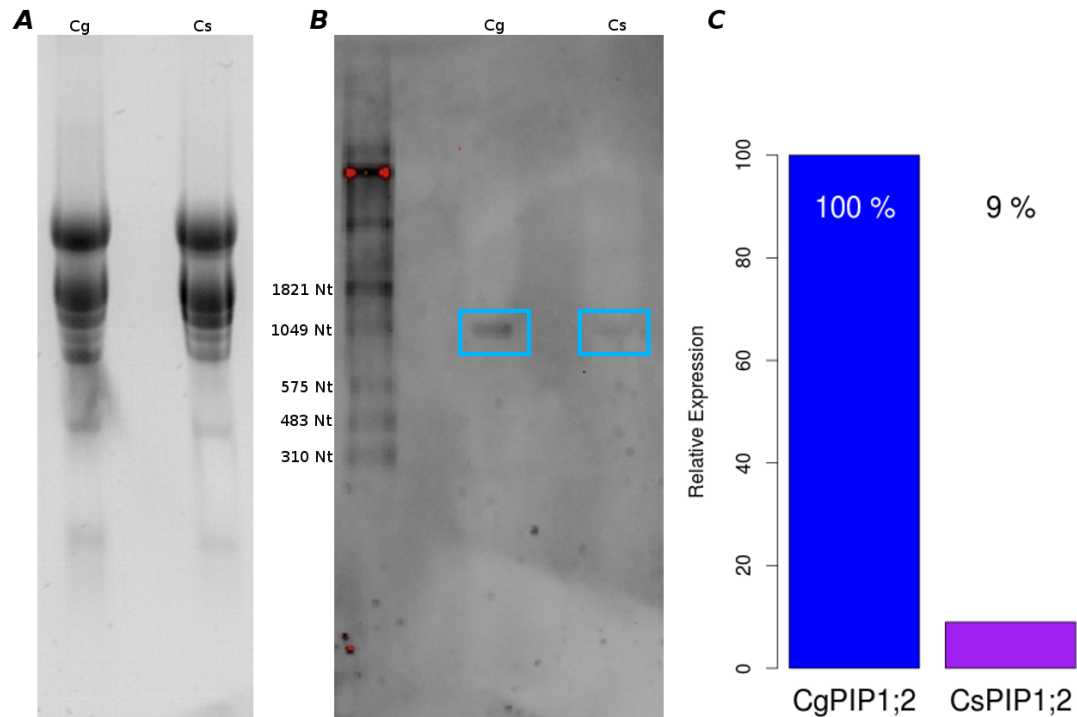
### 3.3 Expressionslevel der Transkripte von CgPIP1;2 und CsPIP1;2

#### 3.3.1 Quantitativer Northern Blot

Ziel war es zu untersuchen, ob Aquaporine ein wesentlicher Teil der C4-Photosynthese sind. So wurde gezeigt, dass das sowohl die Überexpression als auch eine Reduktion der Transkripte von Aquaporinen wie AtPIP1;2 oder NtAQP1 zu einer entsprechenden Veränderung der Assimilationsraten in den entsprechenden C3-Pflanzen (*A. thaliana* und *N. tabacum*) führte. Das Ausschalten der Funktionalität von AtPIP1;2 führt zu einem veränderten Aufnahmeverhalten der Pflanzen von CO<sub>2</sub> (Uehlein et al. (2012)). Um nun die Rolle der Aquaporine in der C4-Photosynthese aufzuklären sollte verglichen werden, ob sich die Expression in den beiden untersuchten Pflanzen unterscheidet. Es wurde in der Literatur (Bräutigam et al. (2011)) beschrieben, dass die Transkriptmenge von CgPIP1;2 20-fach erhöht ist im Verleich zu CsPIP1;2. Dies wurde durch die Auswertung von 454-Sequenzierungsdatensätzen von cDNA aus 56-Tage alten Pflanzen bestimmt. Um dies experimentell zu bestätigen, wurde zur Durchführung eines quantitativen "Northern Blots" die Gesamt-RNS (dt.: Ribonucleinsäure; eng.: ribonucleic acid, RNA) aus 8 Wochen alten *C. gynandra* und *C. spinosa* isoliert. Die entsprechenden Sequenzinformationen und cDNA (eng.: complementary DNA, dt.: komplementäre DNS) wurden von A. Weber (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und durch Sequenzierung bestätigt. Eine Kreuzreaktion der Sonden wurden in einem Vorversuch ausgeschlossen. Nach Durchführung des Northern Blots wurden die Grauwerte der Banden des Northern Blots



quantifiziert. Hierbei ergab sich ein Signal von CsPIP1;2 das 9 % im Vergleich zum Signal von CgPIP1;2 betrug (siehe Abbildung 3.8). Mittels Histogramm wurde überprüft, ob die Signale sich ausreichend von den Grauwerten des Hintergrundes in Vergleichsflächen abhoben.



**Abbildung (3.8) Northern-Blot auf Gesamt-RNS von *C. gynandra* und *C. spinosa***

(A) Gesamt-RNS aus *C. gynandra* (rechts) und *C. spinosa* (links). (B) Northern Blot mit Gesamt-RNS von *C. gynandra* (rechts) und *C. spinosa* (links). Als Marker wurde ein Digoxigenin-markierter RNS Marker von Roche (RNA molekular weight marker I, digoxigenin-labeled (0,3 - 6,9 kb)) verwendet. Die detektierten Banden sind durch jeweils einen hellblauen Kasten im Blot markiert. (C) Die Grauwerte der Bandenstärken im Northern-Blots auf CgPIP1;2 und CsPIP1;2 wurden mittels ImageJ quantifiziert. Die Werte wurden normiert und CgPIP1;2 wurde 100 % zugewiesen.

### 3.3.2 Nukleotid-Sequenzähnlichkeit der Aquaporine

Es musste ausgeschlossen werden, dass es bei dem Northern Blot zu einer Kreuzreaktion der Sonden kommt. Um die Bindung der Sonden an die Sequenzen der jeweils anderen Spezies abzuschätzen, wurde mittels des Programms ClustalX (Larkin et al. (2007)) die Sequenzähnlichkeit auf Nukleotidebene bestimmt. Es ergab sich eine 90,2 %-ige Identität der 861 Nukleotid (Nt) langen Sequenzen. Die Sequenzähnlichkeit von nur 90,2 % erklärt die in Vorversuchen nicht auftretende Kreuzreaktion zwischen den verwendeten Sonden von CgPIP1;2 und CsPIP1;2. Im Weiteren wurde davon ausgegangen, dass die

Grauwerte proportional zur Expression der entsprechenden Boten RNS (eng.: Messenger RNA, mRNA) sind.

```

CgPIP1;2 ATGGAAGGCAAGGAAGAAGATGTTAGAGTGGGAGCTAACAAGTTCCCGGAGAGACAACCG
CsPIP1;2 ATGGAAGGGAAGGAAGAAGACGTGAGAGTGGGAGCGAACAAGTTCCCGGAGAGACAACCG
*****
CgPIP1;2 ATCGGAACATCGGCGCAAACGGATAAGGACTACAAGGAACCGCCGCGCGCGTGTTC
CsPIP1;2 ATCGGGACATCGGCGCAGACGGACAAGGACTACAAGGAGCCGCGCGCGCGCGTGTTC
*****
CgPIP1;2 GAGCCCGGCGAGCTTTCGTCGTGGTCGTTCTGGAGAGCGGAATCGCAGAGTTCATCGCC
CsPIP1;2 GAGCCAGGCGAGCTGTCCTCGTGGTCGTTCTGGAGGGGCGGATCGCTGAGTTCATAGCC
*****
CgPIP1;2 ACTTTCCTCTTCTATACGTCACTATATTGACAGTTATGGGTGTTAAAAGGTCTCCGAGC
CsPIP1;2 ACTTTCCTCTTCTCTACATCACCGTCTGACCGTCATGGGCGTCAAAAGGTCTCCGAGC
*****
CgPIP1;2 ATGTGTGCCTCCGTTGGAATCCAAGGTATCGCTTGGGCCTTTGGTGGAATGATCTTTGCC
CsPIP1;2 ATGTGTGCCTCCGTTGGAATCCAAGGCATCGCTTGGGCCTTCGGCGGTATGATCTTTGCC
*****
CgPIP1;2 CTCGTCTACTGCACCGCCGGTATCTCTGGTGGACACATCAACCCGGCAGTCACTTTCCGT
CsPIP1;2 CTCGTCTACTGCACCGCTGGTATCTCCGGTGGACACATCAACCCGGCCGTGACCTTCGGA
*****
CgPIP1;2 CTGTTCTTAGCCCGGAAGCTGTGCTAACCAGAGCCGTGTACTACATGGTGATGCAATGC
CsPIP1;2 CTGTTCTTGCCAGGAAGCTGTGCTCAACCAGAGCCGTGTACTACATGGTGATGCAATGC
*****
CgPIP1;2 TTGGGAGCCATCTGTGTTGCCGGTGTGGTGAAGGGATTCCAGTCATCACAGTACCAGAT
CsPIP1;2 TTGGGAGCCATCTGTGTTGCAGGTGTGGTCAAGGGTTCCAGCCGTGCGAGTACCAGATT
*****
CgPIP1;2 CTGGGTGGTGGAGCCAACACCGTGAACCATGGTTACACCAAGGGTGATGGTCTTGCGCT
CsPIP1;2 CAGGGCGTGGGGCCAACACCGTGAACCATGGCTACACCAAGGGTGACGGCCTTGCGCT
*
CgPIP1;2 GAGATTGTTGGCACCTTTGTCCTTGTTTACACCGTCTTCTCTGCTACTGACGCAAGAGA
CsPIP1;2 GAGATCATCGGCACCTTTGTCCTCGTTTACACCGTCTTCTCTGCCACTGACGCTAAGAGA
*****
CgPIP1;2 AGCGCCCGTGATTCTCACGTTCCTATCTGGCACCCTCCCAATTGGATTGCGAGTGTTC
CsPIP1;2 AGCGCCCGTGACTCTCACGTCCCTATTCTGGCGCCACTCCCAATTGGGTTCGCGAGTGTTC
*****
CgPIP1;2 TTGGTTACCTGGCGACCATCCCCATCACAGGAACAGGCATCAACCCGCCAGAAGTCTA
CsPIP1;2 TTGGTTACCTGGCGACCATCCCCATCACAGGAACAGGCATCAACCCGCCAGAAGTCTT
*****
CgPIP1;2 GGAGCTGCAATCATATACAACAAGGACCACGCTGGGATGACCACTGGATCTTCTGGGTT
CsPIP1;2 GGAGCCGCAATCATCTACAACAAGGACCATGCCTGGGACGACCATTTGGATCTTCTGGGTT
*****
CgPIP1;2 GGACCCCTTCAATTGGTGTGCCCTTGTGCTCTCTACCACCAAGTTGTGATCAGAGCCATT
CsPIP1;2 GGACATTATCGGAGCTGCACCTTGTGCTCTTACCACCAGGTGGTCATCAGAGCCATC
*****
CgPIP1;2 CCTTTCAAGAGCAGTAGCTGA
CsPIP1;2 CCCTTCAAGAGCAGCAGCTGA
**

```

**Abbildung (3.9) Nukleotid-Sequenzähnlichkeit von CgPIP1;2 und CsPIP1;2**  
Ein Alignment mit ClustalX ergab bei 861 Nukleotiden eine 90,2 %-ige Sequenzähnlichkeit von CgPIP1;2 und CsPIP1;2.

### 3.3.3 Zwischenergebnis

Es konnte bestätigt werden, dass eine unterschiedliche Expression der Aquaporine in den verschiedenen *Cleome* bei einem Alter von 8 Wochen gegeben ist.

Da eine unterschiedliche Expression gegeben ist, sollten die Aquaporine auf Aminosäureebene betrachtet werden, um weitere Unterschiede auch auf dieser Ebene zu identifizieren.

## 3.4 Analyse der Unterschiede in der Aminosäuresequenz

Da sich die Transkriptmenge von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 unterscheidet, und beide Pflanzenarten Unterschiede in der Art der Photosynthese aufweisen, wurden die Aquaporine auf Aminosäureebene verglichen. Es musste die Frage geklärt werden, ob es sich bei CgPIP1;2 und CsPIP1;2, um homologe Aquaporine handelt und worin die Unterschiede zwischen den beiden bestehen.

Als Ansatzpunkt, um Unterschiede zwischen CgPIP1;2 und CsPIP1;2 zu betrachten, diente die Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) der beiden Gene. Beide Sequenzen wurden gegeneinander mit dem Programm Lalign (Huang und Miller (1991)) abgeglichen (siehe Abbildung 3.10 (auf der folgenden Seite)) und die Unterschiede in der Sequenz in Tabelle 3.3 (auf der nächsten Seite) festgehalten. Die Sequenzen weisen eine 97,9 %-ige Identität in den 286 Aminosäuren auf (bei einem E-Wert von  $2.6e-184$ ). Dies spricht für eine Homologie der Proteine.

	10	20	30	40	50	60
CgPIP2	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIG	TSAQTDKDYKEPPPAPLFEP	GELSSWSFWRAGIAEFIA			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CsPIP1	MEGKEEDVRVGANKFPERQPIG	TSAQTDKDYKEPPPAPLFEP	GELSSWSFWRAGIAEFIA			
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
CgPIP2	TFLFLYVT	ILTVMGVKRSPSMCASVGIQ	GIAWAFGGMIFALVYCTAGIS	GGHINPAVTFG		
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CsPIP1	TFLFLYIT	VLTVMGVKRSPSMCASVGIQ	GIAWAFGGMIFALVYCTAGIS	GGHINPAVTFG		
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
CgPIP2	LFLARKLSL	TRAVYYMV	MQCLGAICGAGVVKGFQ	SSQYQSL	GGGANTVNHGYTKGDGLGA	
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CsPIP1	LFLARKLSL	TRAVYYMV	MQCLGAICGAGVVKGFQ	PSQYQIQ	GGGANTVNHGYTKGDGLGA	
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
CgPIP2	EIV	GTFLVYTVFSATDAKRSARD	SHVPILAPLPIGFAVFLVHL	ATIPITGTGINPARSL		
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CsPIP1	EIV	GTFLVYTVFSATDAKRSARD	SHVPILAPLPIGFAVFLVHL	ATIPITGTGINPARSL		
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280		
CgPIP2	GAAIIYNKD	HAWDDHWIFWVGPF	IGAALAAALYHQVVIRAIPFKSSS			
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
CsPIP1	GAAIIYNKD	HAWDDHWIFWVGPF	IGAALAAALYHQVVIRAIPFKSSS			
	250	260	270	280		

**Abbildung (3.10) Lalign der Aminosäuresequenz von CgPIP1;2 und CsPIP1;2**  
Vergleich der AS-Sequenz von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 mittels des Programms Lalign Unterschiede in der Sequenz sind rot hervorgehoben.

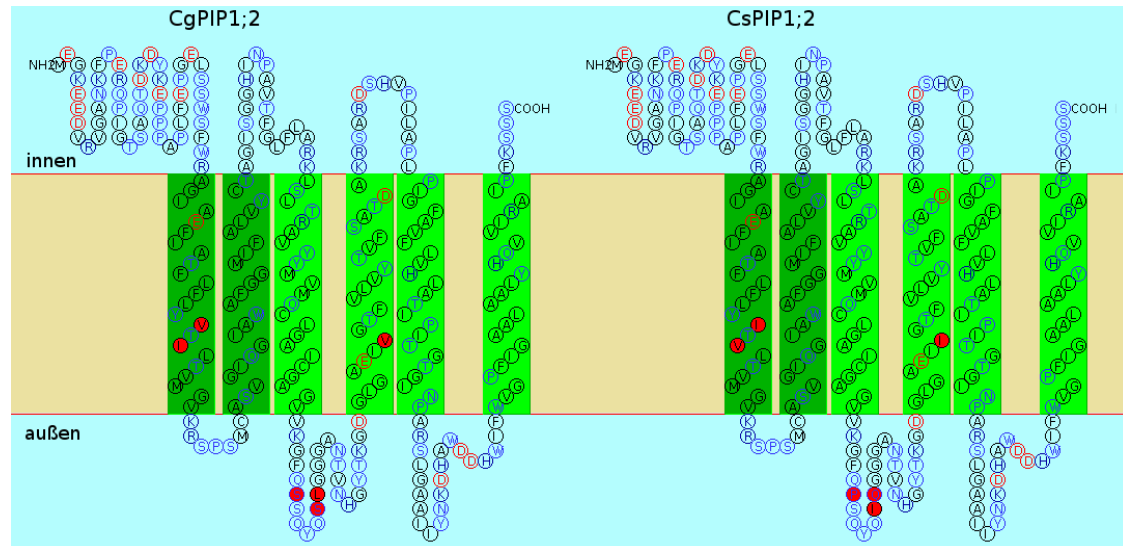
Position	CgPIP1;2	CsPIP1;2
67	Valin (V)	Isoleucin (I)
69	Isoleucin (I)	Valin (V)
155	Serin (S)	Prolin (P)
160	Serin (S)	Isoleucin (I)
161	Leucin (L)	Glutamin (Q)
183	Valin (V)	Isoleucin (I)

**Tabelle (3.3) Position und Unterschiede in der Aminosäuresequenz von *C. gy-*  
*nandra* und *C. spinosa***

Position und Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen CgPIP1;2 und CsPIP1;2.

Um die Positionierung der Unterschiede in der Sekundärstruktur der Membranproteine

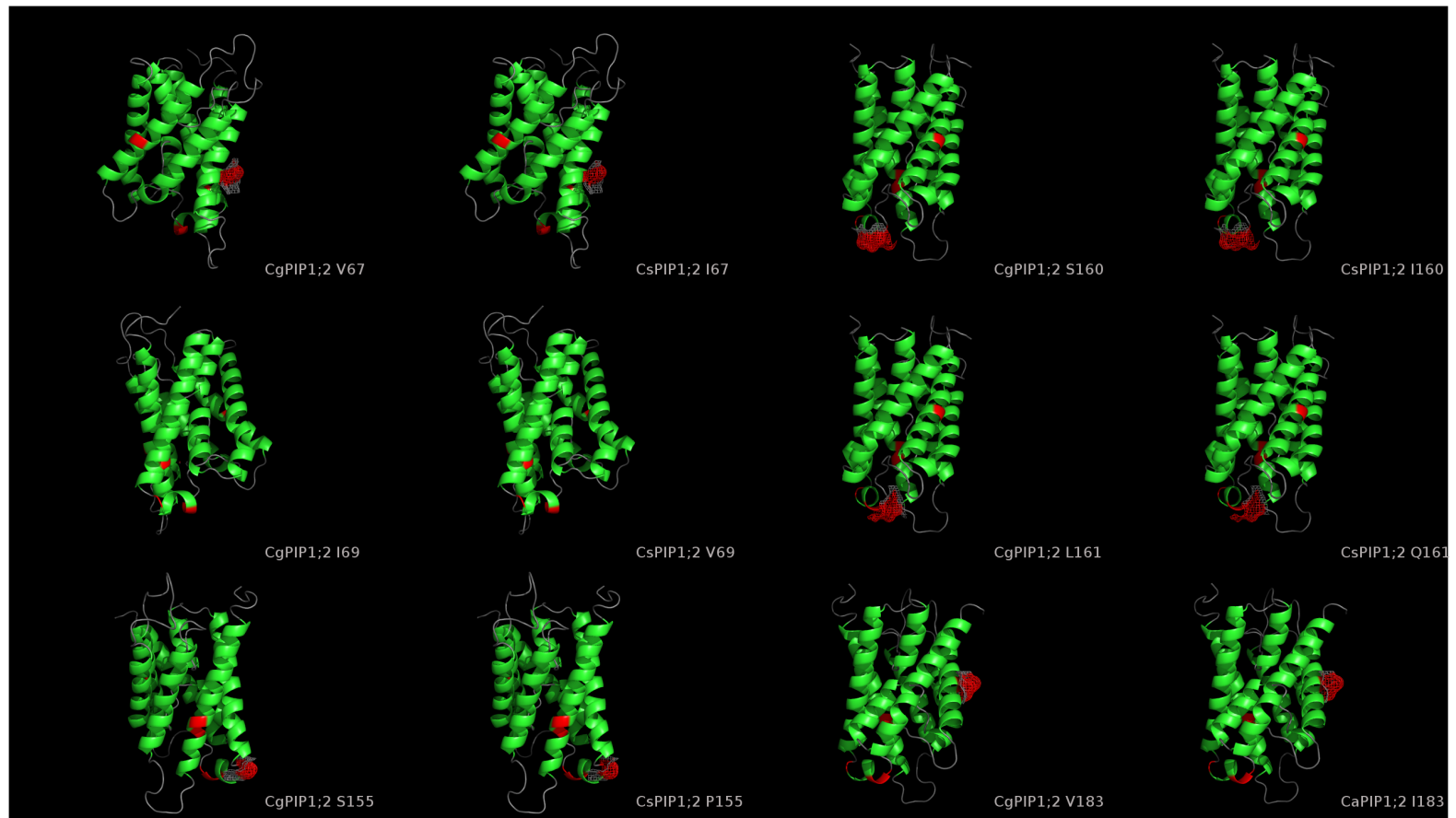
zu analysieren, wurde eine Molekülmodellierung mit dem Programm SOSUI (Hirokawa et al. (1998)) durchgeführt. Auf diese Weise sollte analysiert werden wo sich die Unterschiede in der Sequenz innerhalb der Sekundärstruktur der Membranproteine befinden. Man sieht 3 Positionen: In Helix 1 an Position 67 und 69, in Schleife C an Position 155, 160 und 161 sowie in Helix 4 an Position 183.



**Abbildung (3.11) Sekundärstruktur CgPIP1;2 und CsPIP1;2**

Sekundärstruktur von CgPIP1;2 (rechts) und CsPIP1;2 (links). Die Unterschiede in der AS-Sequenz sind durch rote Ausfüllungen gekennzeichnet. Die Grafik wurde mittels SOSUI (Hirokawa et al. (1998)) erstellt und für eine bessere Übersichtlichkeit modifiziert.

Um eine mögliche Auswirkung der Sequenzunterschiede in der Tertiärstruktur analysieren zu können, wurde eine Molekülmodellierung mit SWISS-MODEL (Schwede et al. (2003); Arnold et al. (2006); Guex und Peitsch (1997)) vorgenommen. Dies diente auch dazu die räumliche Positionen der Sequenzunterschiede vorausszusagen. Die entsprechenden \*.pdb Dateien wurden mit dem Programm PyMol visualisiert und bearbeitet.



**Abbildung (3.12) Tertiär-Struktur CgPIP1;2 und CsPIP1;2**

Molekülmodellierung von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 mit SWISS-MODEL. Die unterschiedlichen Aminosäuren in der Sequenz sind in der Comicdarstellung markiert. Hierbei ist die lokale Moleküloberfläche, beeinflusst durch die entsprechende Aminosäure, durch ein Gitternetz verdeutlicht. Darstellung mit PyMol.

### 3.4.1 Zwischenergebnis

Die Sequenzunterschiede zwischen CgPIP1;2 und CsPIP1;2 betragen 6 von 286 Aminosäuren (2,1 %). Die Sequenzunterschiede an Position 67, 69 und 183 befinden sich in Transmembranhelices und könnten eine Rolle bei der Tetramerisierung durch unterschiedliche räumliche Ausdehnung spielen, da insbesondere Valin und Isoleucin gegeneinander ausgetauscht werden.

Die im extrazellulären Bereich liegenden Aminosäuren sind bei *C. gynandra* mit S155 und S160 zwei polare und mit L161 eine unpolare Aminosäure. *C. spinosa* besitzt hingegen mit P155 und I160 zwei unpolare und mit Q161 eine polare Aminosäure. Falls sich ein funktioneller Unterschied zwischen CgPIP1;2 und CsPIP1;2 aus der unterschiedlichen Aminosäuresequenz ergibt, wären diese Aminosäuren potentielle Ziele einer entsprechenden Betrachtung. Um nun die Funktion der Aquaporine innerhalb der Zelle aufzuklären, wurden diese im heterologen Expressionssystem Hefe untersucht.

## 3.5 Funktionelle Analyse der Aquaporine

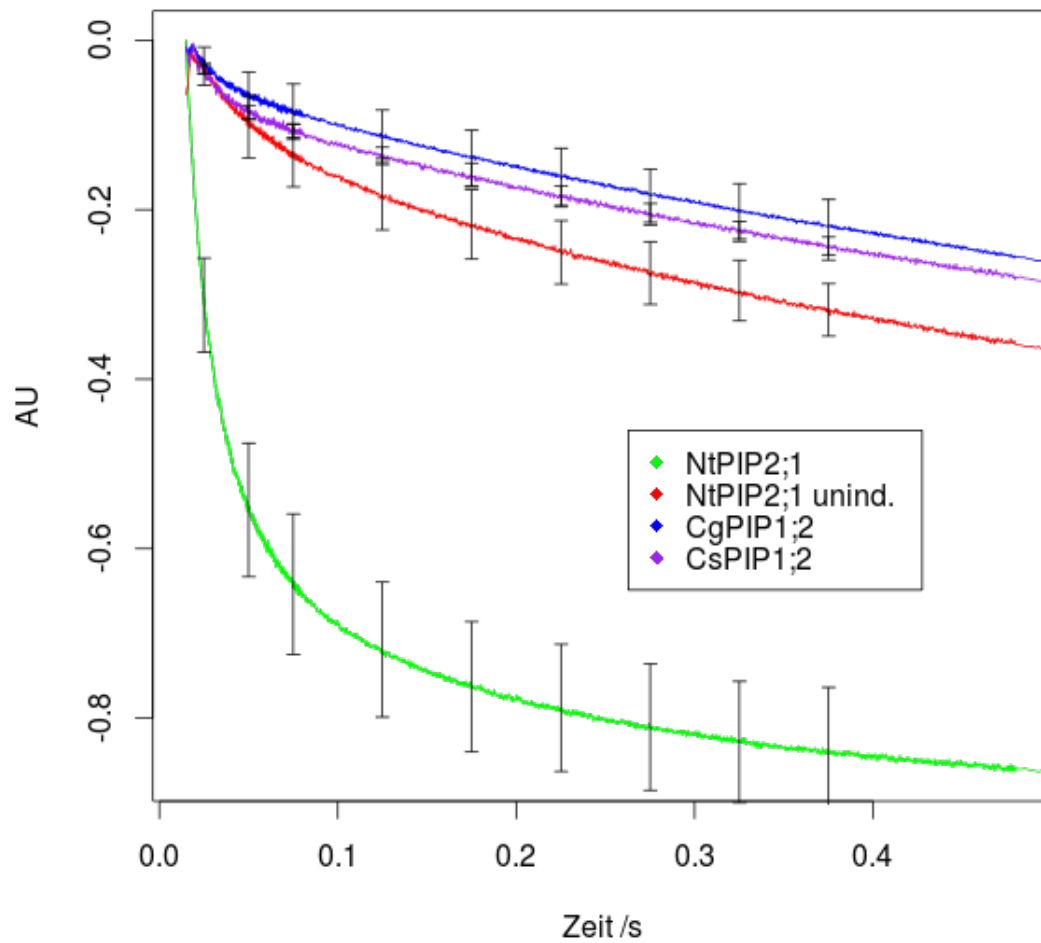
Um die Funktion der Moleküle losgelöst von ihrem pflanzlichen Ursprungssystem untersuchen zu können, wurden sie im heterologen Expressionssystem Hefe mittels Stopped-Flow Spektrophotometrie und Spektrofluorometrie auf Ihre wahrscheinliche Funktion untersucht. Um die Selektivität der Proteine zu überprüfen sollten sie auf eine mögliche Wasserleitfähigkeit untersucht werden. Wegen der Sequenzhomologie zu AtPIP1;2 und dessen dokumentierten Funktion (Heckwolf (2010)) als ein Protein, dass die CO<sub>2</sub>-Diffusion über die Membran erleichtert, sollten die Aquaporine auch auf diese Funktion hin untersucht werden. Als Ausgangspunkt für eine funktionelle Analyse von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 dienten cDNA-Klone von A. Weber (Universität Düsseldorf). Diese wurden in Hefe-Expressionsvektoren in *S. cerevisiae* transfiziert.

### 3.5.1 Einfluss von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auf die Wasserleitfähigkeit

Um eine mögliche Funktion der Aquaporine beim Transport von Wasser zu klären, wurden die transfizierten Hefen protoplastiert und in einem hoch-osmotischen Medium mit einem niedrig-osmotischen Medium in einer Stopped-Flow gemischt. Hierbei wird die Veränderung des Streulichts an den Protoplasten in einem festen Winkel aufgezeichnet. Durch das Anschwellen der Protoplasten kommt es zu einer Reduktion des gemessenen Lichts am Detektor. Durch Osmose und entsprechend dem Wasserpotential nehmen die Hefen Wasser auf. Protoplasten, die Proteine exprimierten die den Wassereinstrom erleichtern, zeigen hierbei ein schnelleres Anschwellverhalten als die uninduzierte Kontrolle. Als Kontrollkonstrukt wurde das bereits als Wasser-leitendes Aquaporin charakterisierte NtPIP2;1 verwendet. Hefen die CgPIP1;2 und CsPIP1;2 exprimierten, zeigten ein Verhalten vergleichbar mit der uninduzierten Kontrolle. In Abbildung 3.13 auf Seite 44 sind die Mittelwertskurven von drei Messungen abgebildet. Aus dem Verlauf der Kurve ließ sich mittels einer Anpassung an den Algorithmus 3 auf Seite 45 die Konstante der Reaktionskinetik ( $k$ ) bestimmen. Damit konnte nun die Osmotische Wasserpermeabilität



(osmotic water permeability,  $P_f$ ) mit dem Algorithmus 4 auf Seite 45 bestimmt werden (wie in van Heeswijk und van Os (1986)). In Abbildung 3.14 auf Seite 46 sowie in Tabelle 3.4 auf Seite 47 ist zu sehen, dass die  $P_f$ -Werte von Hefeprotoplasten mit CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auf dem Niveau der uninduzierten Kontrolle sind. Während die Kontrolle mit NtPIP2;1 einen ca. 5-fach höheren Wert aufweist. Daraus wurde geschlossen, dass die Proteine die Diffusion des Wassers in die Hefeprotoplasten nicht erleichtern.



### Abbildung (3.13) Schwellungskinetiken in Hefeprotoplasten

Schwellungskinetiken von Hefeprotoplasten mit unterschiedlich exprimierten Aquaporinen. Kurven wurden für eine bessere Vergleichbarkeit genullt und normiert sowie Schaltartefakte entfernt. Dargestellt sind die Mittelwertskurven von NtPIP2;1, CgPIP1;2 und CsPIP1;2 mit exemplarischen Standardabweichungen. Als Kontrolle für eine Hefemembran ohne Aquaporine wurden Hefen verwendet bei denen die Expression von NtPIP2;1 nicht induziert wurde ("NtPIP2;1 unind.").

$$f(t) = c * e^{-k*t}$$

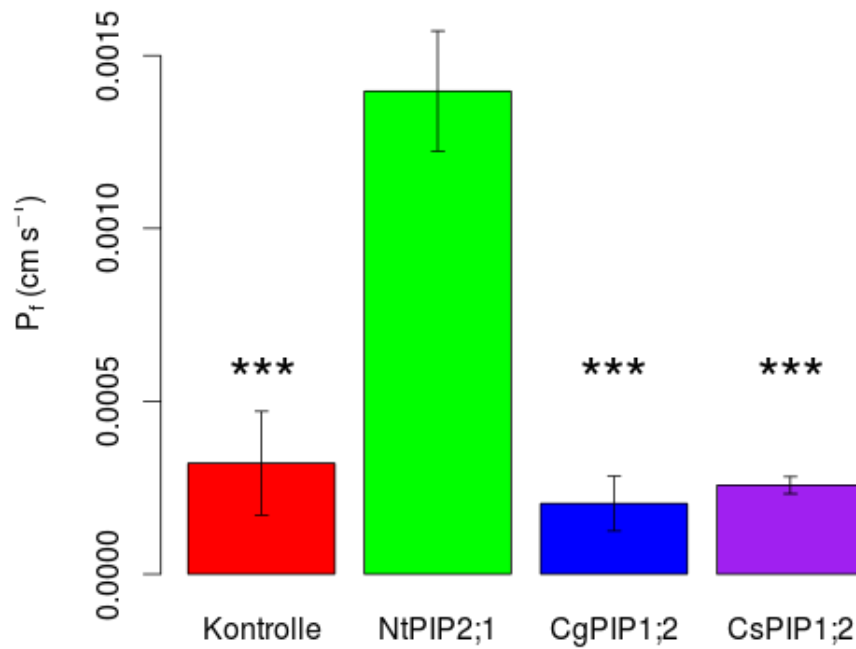
**Algorithmus (3) Exponentieller Fit zur Ermittlung Reaktionskonstante in Stopped-Flow-Messungen**

Mittels der gezeigten Formel wurde eine Kurvenanpassung an den Kinetiken durchgeführt. Die Amplitude (c) war durch die Normierung konstant, während die Reaktionskonstante (k) über den zeitlichen Verlauf (t) über Interpolation berechnet wurden.

$$P_f = k * \frac{V_0}{S_0 * V_W * c_{O-I}}$$

**Algorithmus (4) Formel für die Osmotische Wasserpermeabilität (P<sub>f</sub>)**

Die Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität (P<sub>f</sub>= osmotic water permeability; [cm s<sup>-1</sup>]) erfolgte nach der Formel von van Heeswijk und van Os (1986). Hierbei wurde das molare Volumen von Wasser (V<sub>W</sub>), das Volumen der Protoplasten (V<sub>0</sub>) sowie deren Oberfläche (S<sub>0</sub>), sowie die Differenz der Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen zwischen Innen- und Außenmedium (c<sub>O-I</sub>) zur Berechnung verwendet.



#### Abbildung (3.14) Osmotische Wasserpermeabilität für H<sub>2</sub>O

Die berechneten Werte für die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ). Als Vergleich für Hefen ohne heterolog exprimierte Aquaporine wurde das uninduzierte NtPIP2;1 ("Kontrolle") eingesetzt. Als Kontrolle für die Funktion als wasserleitendes Protein wurde NtPIP2;1 eingesetzt. Sowohl die uninduzierte "Kontrolle" als auch CgPIP1;2 und CsPIP1;2 zeigten jeweils einen signifikanten Unterschied bezogen auf NtPIP2;1. Es wurde jeweils ein two-tailed t-Test bezogen auf die Kontrolle (NtPIP2;1) durchgeführt (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

Konstrukt	$P_f$ (cm s <sup>-1</sup> ) $\pm$ SD
NtPIP2;1 uninduziert ("Kontrolle")	3,21e-04 $\pm$ 1,50e-04 ***
NtPIP2;1	1,40e-03 $\pm$ 1,74e-04
CgPIP1;2	2,04e-04 $\pm$ 7,93e-05 ***
CsPIP1;2	2,57e-04 $\pm$ 2,48e-05 ***

**Tabelle (3.4) Osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ )**

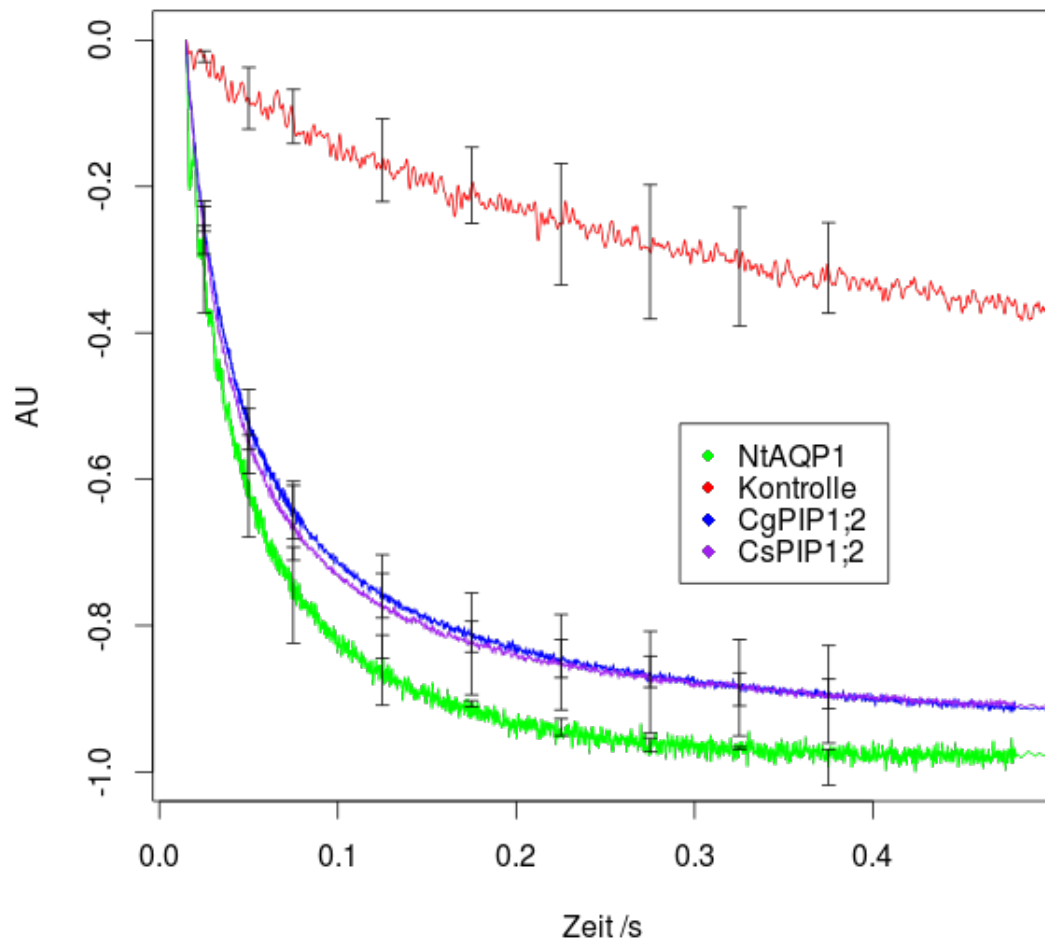
Wiedergegeben sind die Durchschnittswerte für die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) mit Standardabweichung (SD) aus dem H<sub>2</sub>O Assay von Hefeprotoplasten. Es wurde jeweils ein two-tailed t-Test bezogen auf die Kontrolle (NtPIP2;1) durchgeführt (\*\*\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.5.2 Einfluss von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auf die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit

Wegen der hohen Ähnlichkeit zu bekannten CO<sub>2</sub>-Transport vermittelnden Aquaporinen wurde überprüft inwieweit CgPIP1;2 und CsPIP1;2 die Diffusion für CO<sub>2</sub> über die Membran erleichtern. Hierzu wurden die Aquaporine in Hefeexpressionsvektoren in Hefe transfiziert. Damit nicht der Umsatz von CO<sub>2</sub> zu Kohlensäure, sondern die Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Membran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war, wurden die Aquaporine mit Carboanhydrase aus Tabak (Heckwolf (2010)) in den Hefen coexpressiert. Die Überexpression der Carboanhydrase sollte für eine schnelle Umsetzung des Hydrogencarbonats zu CO<sub>2</sub> sorgen. Die Hefen wurden zur Messung mit Fluoresceindiaceetat (FDA) inkubiert, um eine entsprechende "Beladung" mit dem Farbstoff zu erreichen. Danach wurden die Hefen mittels "Stopped-Flow" Spektrofluorometrie vermessen. Dabei wird sie mit einem CO<sub>2</sub>-haltigem Puffer gemischt. Das CO<sub>2</sub> diffundiert über die Membran und wird zu Kohlensäure umgesetzt. Die Kohlensäure zerfällt weiter in Hydrogencarbonat und Protonen. Die freiwerdenden H<sup>+</sup> sorgen beim pH-sensitiven FDA zu einer Veränderung der Quantenausbeute des Fluoreszeins (Slavik (1982, 1983)), dies wird durch das Spektrofluorometer detektiert. Der Einstrom des CO<sub>2</sub> wird indirekt durch die Veränderung des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet. Um das Verhalten der Hefen ohne funktionales Aquaporin zu zeigen, wurde ein Teilstück von NtPIP2;1, bestehend aus 3 Helices, mit der Carboanhydrase zusammen exprimiert (wie in Heckwolf (2010)), im Weiteren "NtPIP2;1 3-Helix" genannt.

In Abbildung 3.15 auf Seite 49 sind die Durchschnittswerte von jeweils 3 Messungen (bestehend aus jeweils 20 Einzelkinetiken) zu sehen. Die Messungen wurden jeweils genullt und normiert, um eine Messamplituden-unabhängige Darstellung zu gewährleisten. Hierbei zeigten Hefen, die CgPIP1;2 oder CsPIP1;2 exprimierten, einen stärkeren Abfall des Signals in kürzerer Zeit verglichen mit NtPIP2;1 3-Helix. Ein vergleichbares Verhalten zeigte NtAQP1, ein Aquaporin, das als ein die CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit erleichterndes Protein beschrieben wurde (Uehlein et al. (2003)). Die Messkurven wurden entsprechend an den Algorithmus 3 auf Seite 45 angepasst, um wiederum die Reaktionskonstante ( $k$ ) zu bestimmen. Damit konnte der Permeabilitätskoeffizient für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) der Plasmamembran der *S. cerevisiae* bestimmt werden. Hierbei wurde der Algorithmus 5 auf Seite 50 zugrunde gelegt. Die in Abbildung 3.16 auf Seite 51 dargestellten  $P_{CO_2}$  Werte sind in Tabelle 3.5 auf Seite 52 nochmals zusammengefasst und ergeben einen Anhaltspunkt

der möglichen Funktion der Aquaporine in der Pflanze. Hefen mit CgPIP1;2 weisen mit einem  $P_{\text{CO}_2}$  von  $1,18\text{e-}05 \pm 1,29\text{e-}06 \text{ cm s}^{-1}$  ebenso wie CsPIP1;2 mit einem  $P_{\text{CO}_2}$  von  $1,28\text{e-}05 \pm 2,93\text{e-}07 \text{ cm s}^{-1}$  einen mit NtAQP1 ( $1,16\text{e-}05 \pm 1,47\text{e-}07 \text{ cm s}^{-1}$ ) vergleichbar hohen Wert auf. Diese Werte sind jeweils verglichen mit der Kontrolle (NtPIP2;1 3-Helix) (mit einem Wert von  $3,62\text{e-}07 \pm 2,03\text{e-}08 \text{ cm s}^{-1}$ ) signifikant erhöht (two-tailed t-Test,  $p < 0,001$ ). Die beiden Aquaporine der *Cleome* scheinen die Diffusion von  $\text{CO}_2$  im heterologen Expressionssystem Hefe zu erleichtern (Vergleiche Abbildung 3.16 auf Seite 51). Eine entsprechende Funktion in der Pflanze ist wahrscheinlich, da sich die Funktion der Aquaporine im nativen und heterologen Expressionssystem nicht unterscheiden sollten.



**Abbildung (3.15) Fluoreszenzkinetik in Hefen**

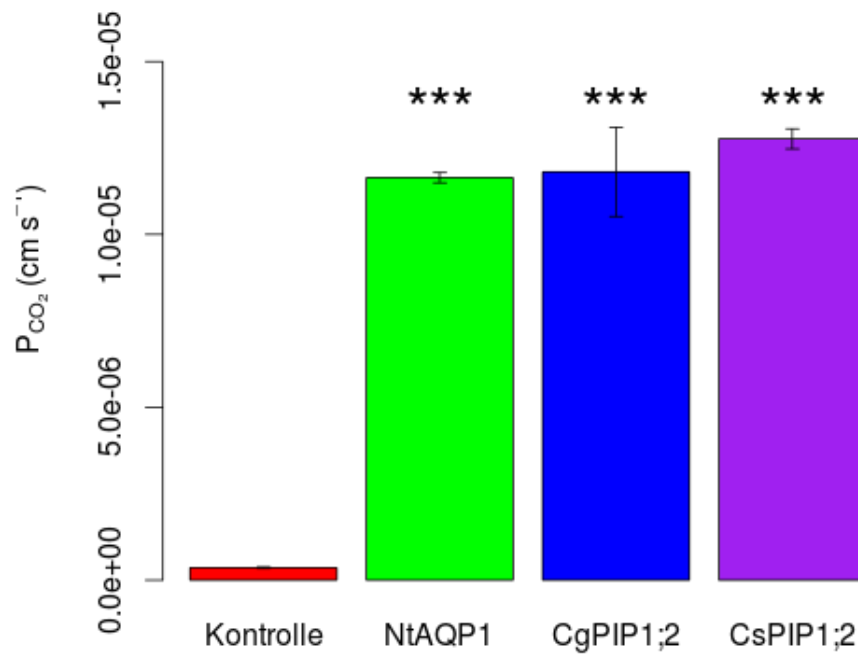
Es wurde ein Fluoreszein-Assay mit Hefen durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwertskurven von jeweils drei Messungen mit exemplarischen Standardabweichungen. Aufgetragen ist das Fluoreszenzsignal über die Zeit. Die Kurven wurden genullt und normiert. Als Kontrolle für eine Hefe ohne CO<sub>2</sub>-Diffusions-vermittelndes Protein wurde NtPIP2;1 3-Helix (“Kontrolle”) eingesetzt.

$$P_{CO_2} = k * \frac{10^{(pH_f - pK_a)}}{(\frac{S_0}{V_o})}$$

**Algorithmus (5) Formel für den Permeabilitätskoeffizient für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>)**

Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub> [\*cm \*s<sup>-1</sup>]) benutzt das Volumen der Hefezelle (V<sub>O</sub>) sowie deren Oberfläche (S<sub>O</sub>), den pK<sub>a</sub> von Kohlensäure und den pH im Inneren der Hefezellen (pH<sub>f</sub>) (Formel nach Yang et al. (2000)).





**Abbildung (3.16) Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) in Hefezellen**

Die berechneten Werte für den Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub>. Als “Kontrolle” für eine Membranprotein ohne CO<sub>2</sub>-leitende Funktion diente NtPIP2;1 3-Helix, der verglichen mit NtAQP1 eine signifikant verringerte Leitfähigkeit aufweist. Bezogen jeweils auf NtPIP2;1 3-Helix waren die Unterschiede von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 auch signifikant erhöht in einem two-tailed t-Test (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

Konstrukt	$P_{CO_2}$ (cm s <sup>-1</sup> ) $\pm$ SD
NtPIP2;1 3-Helix	3,62e-07 $\pm$ 2,03e-08
NtAQP1	1,16e-05 $\pm$ 1,47e-07 ***
CgPIP1;2	1,18e-05 $\pm$ 1,29e-06 ***
CsPIP1;2	1,28e-05 $\pm$ 2,93e-07 ***

**Tabelle (3.5) Permeabilitätskoeffizient für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ )**

Wiedergegeben sind die Durchschnittswerte und Standard Abweichung (SD) für den Permeabilitätskoeffizient für CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) mit Standardabweichung aus den Stopped-Flow-Messungen mittels eines Fluoreszein Assays. Eine signifikante Erhöhung bezogen auf Nt-PIP2;1 3-Helix nach einem two-tailed t-Test ist gegeben (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ).

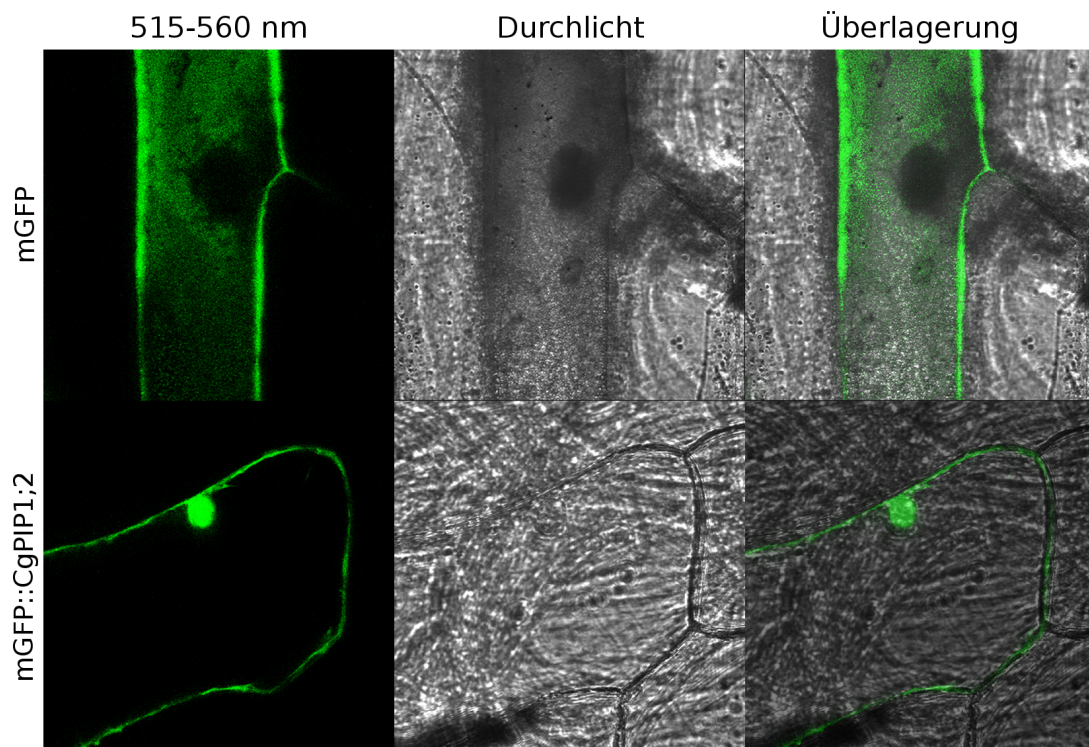
### 3.5.3 Zwischenergebnis

Die Aquaporine CgPIP1;2 sowie CsPIP1;2 führten in Hefen zu keiner Veränderung der Leitfähigkeit für Wasser. Eine Funktion, die qualitativ auf eine Erleichterung der Diffusion von CO<sub>2</sub> durch die Zellmembran hindeutet wurde hingegen beobachtet. Von einer entsprechende Funktion in der Pflanze kann ausgegangen werden. Um die Funktion des Aquaporins CgPIP1;2 in der C4-Photosynthese weiter aufzuklären, ist es notwendig auch deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu ermitteln.

## 3.6 Lokalisation von CgPIP1;2 mittels fluoreszierendem Fusionsprotein

### 3.6.1 Transfizierung von Zwiebschuppenzellen

Um einen Anhaltspunkt für die Funktion von CgPIP1;2 zu gewinnen, sollte deren Lokalisation innerhalb der Zelle bestimmt werden. Dafür sollte das Aquaporin mit einem fluoreszierenden Protein markiert und damit Pflanzenzellen transfiziert werden. Hierfür wurde eine C-terminale Fusion mit mGFP gewählt. Als Versuchsobjekt wurde wegen der einfacheren Handhabbarkeit Zwiebschuppenzellen gewählt. Diese wurden mittels "Biolistic Bombardement" transfiziert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transfizierung wurde cytosolisches GFP verwendet. Mittels "Konfokalem Laser Scanning Mikroskop" wurde das Pflanzenmaterial auf transformierte Zellen hin untersucht. Wie in Abbildung 3.17 (auf der folgenden Seite) zu sehen gibt es ein Signal, das mit der Region der Zellwand, an der sich die Plasmamembran befindet, kolokalisiert. Das Signal beschränkt sich hierbei (bis auf wahrscheinliche Invaginationen) auf den äußeren Bereich der Zelle. Im Gegensatz hierzu wiesen Zellen, die mit dem cytosolischen GFP transformiert wurden, eine örtlich weniger begrenztes Signal auf. Zwiebschuppenzellen beschossen mit Wolframpartikeln ohne Plasmid-DNA zeigten kein entsprechendes Emissions-Signal im Bereich von  $\lambda = 515$  bis 560 nm. Diese Befunde können als erster Anhaltspunkt für eine mögliche Lokalisation von CgPIP1;2 in der Plasmamembran gesehen werden.



**Abbildung (3.17) Lokalisation in Zwiebschuppenzellen**

Lokalisation von GFP-markiertem CgPIP1;2 in Zwiebschuppenzellen. (Von links nach rechts) Emissionsspektrum von  $\lambda = 515 - 560$  nm, Durchlicht und Überlagerung beider Bilder. (Oben) Zwiebschuppenzellen transformiert mit pCAMBIA1302. (Unten) Zwiebschuppenzellen transformiert mit pMDC83\_CgPIP::mGFP.

### 3.6.2 Zwischenergebnis

Die Aquaporine weisen eine gleiche Funktion im heterologen Expressionsmodell auf. Weiterhin ist eine Lokalisation des Aquaporins in der Plasmamembran der C4 Pflanze wahrscheinlich. Dennoch konnte eine unterschiedlich starke Expression in den Pflanzen festgestellt werden. Um nun der Funktion von CgPIP1;2 auf den Grund zu gehen, sollte ermittelt werden, wie eine reduzierte Expression des Aquaporins sich innerhalb der Pflanze auswirkt.

## 3.7 “Virus Induced Gene Silencing” mit TRV

Um die Funktion von CgPIP1;2 in der C4-Photosynthese von *C. gynandra* aufzuklären, sollte ermittelt werden wie sich eine reduzierte Expression auf die Photosynthese der Pflanze auswirkt.

Mittels *Virus Induced Gene Silencing* (VIGS) sollte ein “knock-down” der PIP1;2 durchgeführt werden und die Auswirkung dieses knock-downs mittels Gaswechselmes-

sungen analysiert werden. Der “knock-down” führt zu einer zielgerichteten Verringerung spezifischer Transkripte und damit zu einer Verringerung des Genproduktes. Bei einem VIGS mittels des *Tobacco rattle virus* (TRV) werden Pflanzen mit zwei Sequenzen des TRV infiziert. Dieser löst einen RNS-Interferenz (eng.: RNAi) Effekt in der Pflanze aus. Die RNAi-Effekt beruht auf der Wechselwirkung kurzer Stränge von RNS mit einem Enzymkomplex und der Boten-RNS (eng.: messenger RNA, mRNA). Die kurzen Stränge der RNS vermitteln eine Basenpaarkomplementarität zum Zieltranskript, so dass nur die komplementäre mRNA abgebaut wird. Das entsprechende Ziel-Gen wird hierfür in den entsprechenden Vektor eingebracht. Die Sequenzen des TRV sind pTRV1 und pTRV2. Diese liegen jeweils in einem T-DNA (eng.: Transfer-DNA) Vektor vor. Während pTRV1 eine RNS-abhängige RNS Polymerase sowie ein Bewegungs-Protein trägt, enthält pTRV2 das Hüllprotein sowie einen Polylinker (eng.: Multiple Cloning Site, MCS), in die die herabzuregulierende Sequenz kloniert wurde. Beide Sequenzabschnitte sind flankiert von der “linken” und der “rechten” Begrenzung der T-DNA was zu einer Agrobakterien medierten Inserierung der pTRV1 & 2 in das Genom der Wirtspflanze führen soll.

Für die Durchführung des Experimentes waren folgende Bedingungen zu erfüllen: Der VIGS Effekt durch den TRV musste erfolgreich in *Cleome* angewandt werden können und dies musste einfach nachzuweisen sein. Weiterhin dürften spezifisch nur die Cg-PIP1;2 sowie CsPIP1;2 herabreguliert werden und keine anderen Funktionen der Pflanze beeinträchtigt werden.

Insbesondere musste das grundsätzliche Funktionieren des knock-downs mittels VIGS in den *Cleome* möglich sein. Hierfür war ein entsprechender Nachweis notwendig. Um dieses Erfordernis zu erfüllen, waren bioinformatische Arbeiten mit den Sequenzdaten der beiden Pflanzen erforderlich.

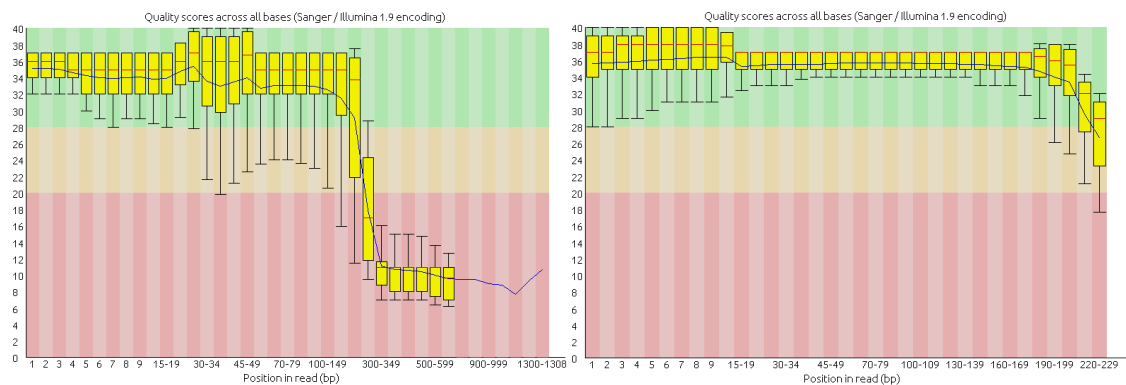
### 3.7.1 Bioinformatische Arbeiten

#### 3.7.1.1 Erstellen eines Transkriptom

Für die Durchführung des VIGS war es notwendig als Kontrolle für das Funktionieren der Infektion einen knock-down eines Transkriptes durchzuführen, der zu einem leicht zu erkennenden Phänotypen führt. So kann das grundsätzliche Funktionieren des VIGS mittels der pTRV1 & 2 in *C. gynandra* und *C. spinosa* getestet werden. Es wurde die Phytoendesaturase gewählt da deren knock-down in Tomate (Albert (2005)) sowie in *Nicotiana benthamina* zu einer Verhinderung der Karotinoidbiosynthese und damit zu einer klar erkennbaren Bleichung von Blättern und Sprosssteilen führt. Hierfür war jedoch die Kenntnis der Sequenzen der in *Cleome* vorhandenen Phytoendesaturasen notwendig. Ebenso war es notwendig ihre Expressionslevel zu kennen falls mehrere Sequenzen gefunden wurden. Diese Sequenzen sowie deren Abundanz waren jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Erhältlich waren als Ausgangsdaten 454-Sequenzierungen von cDNA aus *C. gynandra* und *C. spinosa*. Aus diesen Datensätzen mussten also die Sequenzen von Phytoendesaturasen identifiziert sowie deren Häufigkeit bestimmt werden.

Die 454-Sequenzierungen lagen bei NCBI als \*.sra Dateien vor. Diese Dateien wurden mittels des SRA Toolkits in \*.fastq Dateien umgewandelt um sie editierbar zu machen.

Die für die 454-Sequenzierung notwendigen Adaptersequenzen am 5'-Ende der Sequenzierungen aus dem fastq-Datensätzen wurden identifiziert und mittels eines BASH-Skriptes entfernt. Da bei einer 454-Sequenzierung die Signale individueller Vertiefungen auf dem Chip ausgewertet werden, mussten die Sequenzen überprüft und Sequenzbereiche mit unzureichender Qualität entfernt werden. Eine entsprechende Überprüfung wurde mit dem Programm fastqc durchgeführt. Die Sequenzen wurden zugeschnitten so dass nur Sequenzbereiche mit hohen Qualitätswerten (mit einem Median des "Phred Quality scores" > 30) für die Folgeschritte verwendet wurden. Die Sequenzen wurden auf eine Länge von 229 Bp ausgehend vom 5'-Ende gekürzt, um Sequenzbereiche mit niedriger Qualität zu entfernen.



**Abbildung (3.18) FASTQC Ausgabe Beispiel**

Beispiel für die Überprüfung der Qualität (Quality scores) der Sequenzen vor und nach der Bearbeitung. **(Links)** Qualitätswerte der Sequenzdaten *vor* der Bereinigung. **(Rechts)** Qualitätswerte *nach* der Bereinigung. Aufgetragen gegen die Qualitätswerte sind die Positionen der Basen innerhalb einer Sequenz.

Für die weitere Bearbeitung wurden die \*.fastq mit dem Programm fastq\_to\_fasta zu \*.fasta Datensätze umgewandelt. Die Sequenzdaten wiesen nach der Überarbeitung die in Tabelle 3.6 ausgewiesenen Eigenschaften auf. Das weitere Vorgehen ist in Abbildung 3.19 auf Seite 59 schematisch dargestellt.

454-Seq.	Vor Bereinigung	Nach Bereinigung	No. Sequenzen	Max. Länge
<i>C. gynandra</i>	108.3 MBp	56.2 MBp	254.561	229 (Bp)
<i>C. spinosa</i>	84.6 MBp	40.3 MBp	183.064	229 (Bp)

**Tabelle (3.6) 454-Sequenzierung nach Bereinigung**

Der Umfang der 454-Sequenzierungen (454-Seq.) vor und nach den Bereinigungsschritten (in Millionen Basenpaare (MBp)). Wiedergegeben ist die Ausgangssequenzierung, die Gesamt-Zahl der Basen vor und nach der Bereinigung, die Anzahl der Sequenzen nach der Bereinigung sowie die maximale Länge der Sequenzen nach der Bereinigung.

Aus den bereinigten Sequenzen wurde mittels des Programms Trinity ein Transkrip-

tom aus den überlappenden Sequenzen erstellt. Als Referenz zum “mappen” der Sequenzen wurde das Genom von *Arabidopsis thaliana* (entsprechend Bräutigam et al. (2011)) verwendet. Hierbei wurden 12455 Sequenzen beim *C. gynandra* Datensatz und 7770 Sequenzen beim *C. spinosa* Datensatz erstellt.

### 3.7.1.2 BlastX

Ausgehend von den Trinity-Datensätzen sollten nun Sequenzen, die eine Phytoendesaturase kodieren, identifiziert werden. Hierfür wurde ein automatisierter BlastX gegen alle Sequenzen des Transkriptoms genutzt um allen Sequenzen bereits bekannte, homologe Proteine zuzuordnen. Bei einem BlastX wird ein Vergleich der translatierten Nukleotidsequenz zu bekannten Proteinsequenzen in der NCBI-Datenbank durchgeführt. Der BlastX wurde gewählt, um die möglichen korrespondierenden Proteine zu den Sequenzen im Transkriptom zu ermitteln. Hierzu wurde mittels eines BASH-Skriptes ein automatisierter BlastX der Transkriptomsequenzen gegen die Proteindatenbank durchgeführt. Um Proteine mit einer geringen Ähnlichkeit auszuschließen und, um unnötige Metadaten zu entfernen, wurde das Ergebnis des BlastX mittels eines Pythonskriptes aufbereitet. Das Ergebnis war eine Datenbank mit Sequenzen des Transkriptoms mit Ähnlichkeit zu bekannten Aminosäure-Sequenzen mit einem mindest E-Value. Es wurden die 10 Sequenzen mit den niedrigsten E-Values aber mit einem Höchstwert von 0,05 zusammengeführt. Nahezu jeder Sequenz aus dem Transkriptomdatensatz wurden damit jeweils zehn homologe Proteine zugeordnet.

Transkriptom	Sequenzen	Identifizierte Seq.	nicht identifizierte Seq.
<i>C. gynandra</i>	12455	12229	226
<i>C. spinosa</i>	7770	7695	75

**Tabelle (3.7) Sequenzen nach BlastX**

Anzahl der Sequenzen die als Eingabe in den BlastX dienten. Dies entspricht der durch Trinity erzeugten Sequenzen. Weiterhin die Anzahl der beim BlastX identifizierten und nicht identifizierten Sequenzen.

### 3.7.1.3 BlastN des Transkriptoms gegen AthPDS3 Sequenz

Um nun Sequenzen von Phytoendesaturasen aus dem Transkriptom die bei einem BlastX keine ausreichende Ähnlichkeit zu bekannten Proteinsequenzen aufwiesen, sollte ein Vergleich auf Nukleotidebene durchgeführt werden. Hierzu wurden die Sequenz der bereinigten 454-Sequenzierung gegen die Sequenz von AthPDS geblastet. Durch die Zugehörigkeit beider Gattungen zur Ordnung der Brassicales waren Sequenzähnlichkeiten auf Nukleotidebene zwischen den Phytoendesaturasen zu erwarten. Auf diese Weise erhielt man Contigs mit einer mindest Sequenzähnlichkeit auf Nukleotidebene (E-Value < 0,01). Identifizierte Contig-Sequenzen dienten zur Identifikation von Sequenzen im assemblierten Transkriptom.

Hierzu wurden die voraussichtlichen PDS Contigs gegen das assemblierte Transkriptom geblastet. Da die Contigs kürzer waren als die Sequenzen im assemblierten Transkrip-

tom konnten nun Sequenzen identifiziert werden, die nur eine teilweise Ähnlichkeit mit AthPDS aufweisen, jedoch dennoch eine PDS kodieren.

Die gefundenen Sequenzen wurden danach mittels BlastX dahingehend untersucht ob sie eine PDS kodieren. Es wurden nur Sequenzen mit einem E-Value < 0,01 berücksichtigt.

#### 3.7.1.4 Isolation von Phytoendesaturase (PDS) Sequenzen

In dem durch den BlastX resultierenden Datensatz wurden alle Sequenzen die eine “phytoene desaturase” kodierten identifiziert und gegen alle Sequenzen die sich durch den BlastN ergaben abgeglichen. Als Phytoendesaturasen wurden die in Tabelle 12.3 aufgeführten Sequenzen gefunden. Die gefundenen Sequenzen von *C. gynandra* wurden an überlappenden Abschnitten assembliert. Bei *C. spinosa* wurde nur eine Sequenz ermittelt. Diese Sequenzen dienten als Ausgangspunkt für die Folgeexperimente.

#### 3.7.1.5 Quantifizierung PDS Sequenzen

Die Quantifizierung der gefundenen Sequenzen erfolgte mittels Pythonskript. Die Häufigkeit der “reads” (also die durch die Sequenzierung ermittelten Sequenzen) in der Sequenzierungsdatei die an die Sequenzen der PDS binden, wurden diese mittels Pythonskriptes quantifiziert. Hierbei wurden sie normiert auf Anzahl pro Millionen bzw. als Anzahl pro Millionen und Länge in Basenpaaren (als reads pro Millionen reads bzw. reads pro Millionen reads pro Länge (Bp)). Hierfür wurden die Sequenzen der bereinigten Sequenzierungsdatei gegen die CDS der Phytoendesaturasen mittels BlastN abgeglichen und die Sequenzen mit dem niedrigsten E-Value von maximal 0,01 der entsprechenden PDS-Sequenz zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12.3 aufgeführt.

Organismus	Sequenzen	No. Treffer in 454- Seq.	Länge (Nt)	Treffer/ Million Reads	Treffer/ (Mio.R.* Länge)
<i>C. gynandra</i>	comp4034_c0_seq1	108	1517	424,3	0,3
	comp4034_c0_seq2	150	811	589,2	0,7
	comp4273_c0_seq1	1113	691	4372,2	6,3
	comp4273_c0_seq2	841	582	3303,7	5,7
	comp6050_c0_seq1	205	309	805,3	2,6
<i>C. spinosa</i>	comp4826_c0_seq1	1423	696	7773,2	11,2

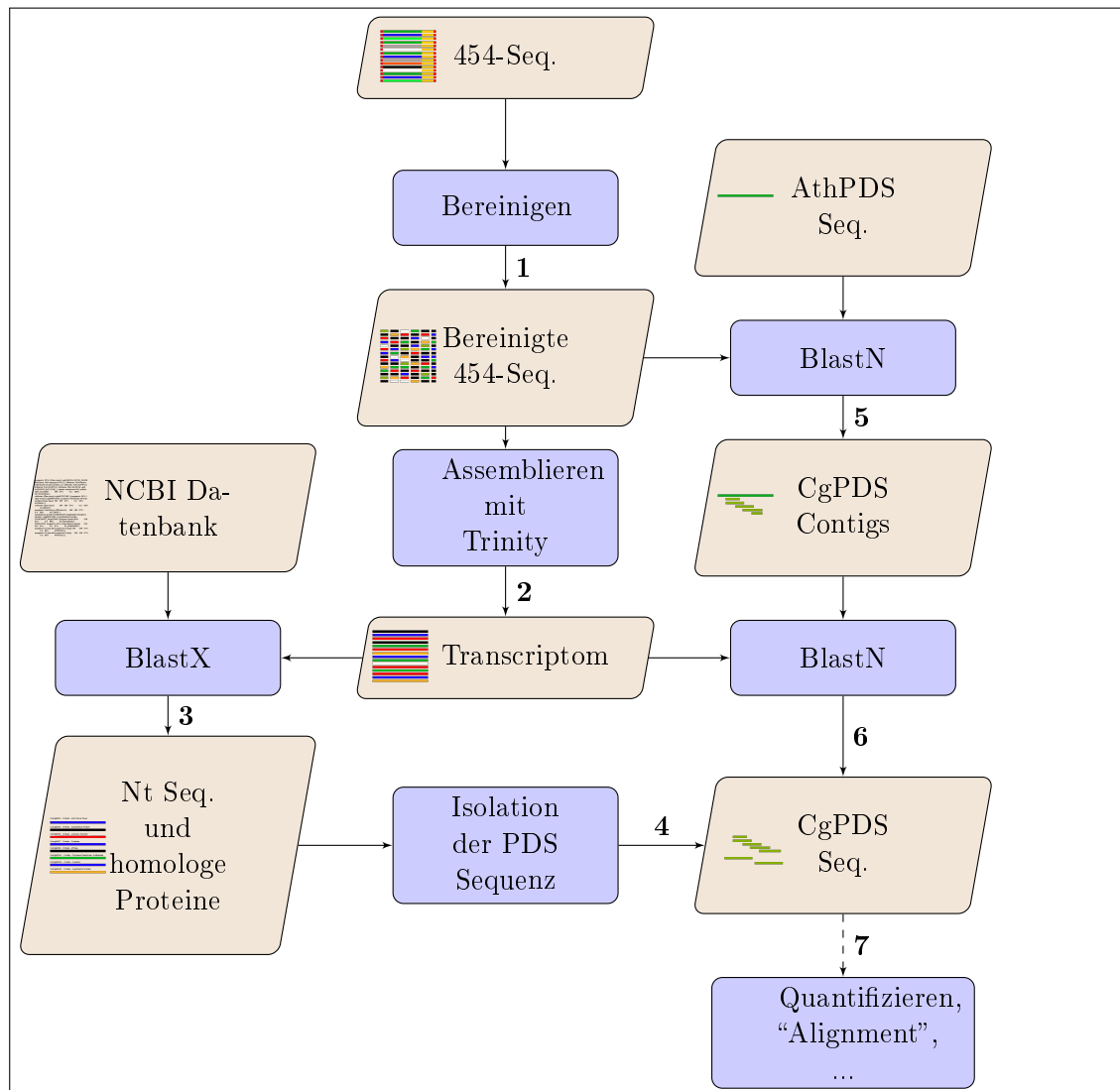
**Tabelle (3.8) Quantifizierung der PDS-Sequenzen**

Sequenzen die als Phytoendesaturase aus den 454-Sequenzierungen identifiziert wurden. Aufgeführt sind die Sequenzen, ihre Anzahl im Transkriptom, ihre Länge in Nukleotiden, ihr relatives Vorkommen bezogen auf 1 Millionen Reads und ihr relatives Vorkommen bezogen auf 1 Millionen Reads und normiert auf ihrer Länge.

Das Gesamte Vorgehen ist in Abbildung 3.19 auf Seite 59 schematisch dargestellt. Aus-

gangspunkt der Bearbeitung war die Adapter und Qualitäts bereinigte 454-Sequenzierung **(1)**. Diese wurde mittels Trinity zur Erstellung längerer Contigs **(2)** assembliert. Die Contigs wurden mittels BlastX bekannten Proteinen zugeordnet **(3)**. Aus der Liste der Proteine wurden nun alle Nukleotidsequenzen die eine Phytoendesaturase codieren isoliert **(4)**. Auf diese Weise wurden Sequenzen identifiziert die bekannten PDS-Sequenzen entsprachen. Um nun auch Sequenzen zu identifizieren die durch die Filtermechanismen **(1 - 4)** durchfallen, wurde die 454-Sequenzierungsdaten in einem BlastN gegen die Sequenz von AthPDS “alignt” **(5)** und entsprechende Sequenzen isoliert. Diese wurden gegen den Trinitydatensatz alignt, um längere Sequenzabschnitte zu isolieren die auf Nukleotidebene keine hohe Ähnlichkeit zu AthPDS besitzen **(6)**. Die jeweils identifizierten PDS Sequenzen wurden quantifiziert und auf überlappende Sequenzen hin untersucht **(4 und 6)**, um die zur Klonierung verwendete CgPDS Sequenz zu erstellen **(7)**. Analog hierzu wurden die Sequenz von CsPDS isoliert.





**Abbildung (3.19) Bioinformatisches Vorgehen zur Identifizierung von CgPDS**  
 (1) Adapter- und Qualitätsbereinigte 454-Sequenzierung, (2) Transcriptom (erstellt mit Trinity), (3) Homologe Proteine (mit BlastX), (4) Isolation von Phytoene Desaturase Sequenzen, (5) "Contigs" die homolog zu Phytoene Desaturase Sequenzen zu *A. thaliana* sind (mit BlastN), (6) Sequenzen im Transcriptom mit Ähnlichkeit zu kürzeren "Contigs", (7) Quantifizierung, "Alignment", Assemblierung von CgPDS Sequenzen. Beige farbige Kästen kennzeichnen Sequenzen. Blaue Kästen kennzeichnen Bearbeitungsschritte mit Programmen.

### 3.7.1.6 PDS Sequenz und ungewollte Nebenreaktionen

Die für den VIGS-Effekt zu verwendenden Sequenzen sollten einer Herabregulierung der Zielsequenzen dienen. Sie sollten jedoch nicht die Expression anderer Gene beeinträchtigen. Da für einen RNAi Effekt mittels VIGS mindestens ein 21 – 23 Nt langer Ab-

schnitt vorliegen muss, wurde die Sequenz der PDS mittels Pythonskript in alle möglichen 21-mere unterteilt und als Datenbank verwendet, um einen entsprechenden BLAST gegen die Trinity Datenbank vorzunehmen. Auf diese Weise sollten Sequenzabschnitte identifiziert werden die auf Nukleotidebene eine 100-%-ige Sequenzabdeckung über alle verschiedenen PDS-CDS aufweist und somit möglichst viele Sequenzen bei einem RNAi-Effekt abdecken sollte.

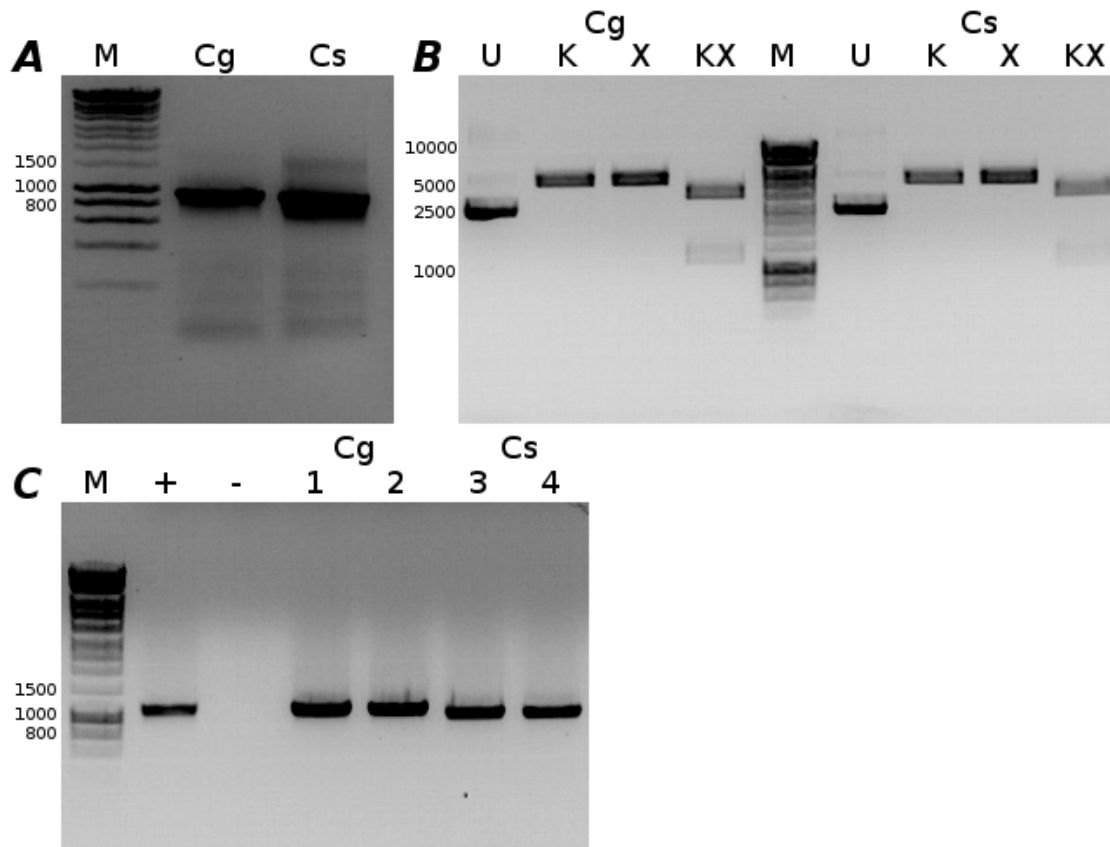
Weiterhin sollte ausgeschlossen werden, dass die 21-mere sequenzidentisch mit andere Sequenzen sein könnten. Dies hätte zu einem ungewollten Effekt auf diese Sequenzen geführt, was ausgeschlossen werden sollte. Bei dem BLAST wurden nur Sequenzen identifiziert die zu der verwendeten PDS-Sequenz gehörten. Ein ungewollter Nebeneffekt des VIGS auf andere Transkripte war somit ausgeschlossen.

### 3.7.1.7 Zwischenergebnis

Aus 454-Sequenzierungsdaten konnten mittels verschiedener bioinformatischer Arbeitsschritte die Sequenzen von CgPDS und CsPDS isoliert und quantifiziert werden. Diese dienten in Folgeexperimenten zur Isolierung der korrespondierenden DNS Sequenz aus Pflanzenmaterial.

### 3.7.2 Klonierung von CgPDS und CsPDS

Um CgPDS und CsPDS zu isolieren wurde eine PCR (eng.: Polymerase Chain Reaktion, dt.: Polymerasekettenreaktion) auf auf cDNA von 28 Tage alten *C. gynandra* bzw. *C. spinosa* durchgeführt (Abbildung 3.20 A auf Seite 61). Die PCR-Fragmente wurden mittels TA-Klonierung in den Vektor pDrive einkloniert und danach mit PCR mit M13 Primern amplifiziert und die PDS-Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz entsprach der durch die bioinformatischen Methoden bestimmten Sequenz. Ein BlastX der Sequenzierung ergab beispielhaft eine 92 % Identität mit der Phytoendesaturase aus *Brassica rapa* sowie eine 96 % Identität zur PDS-3 aus *Arabidopsis thaliana*. Eine Klonierung in pTRV2 mittels KpnI und XhoI (Abbildung 3.20 B) wurde durchgeführt und pTRV2\_CgPDS und pTRV2\_CsPDS in *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm: LBA4404) kloniert. Es erfolgte der Nachweis der Transformation der Agrobakterien über PCR (Abbildung 3.20 C).



### Abbildung (3.20) Klonierung von CgPDS und CsPDS

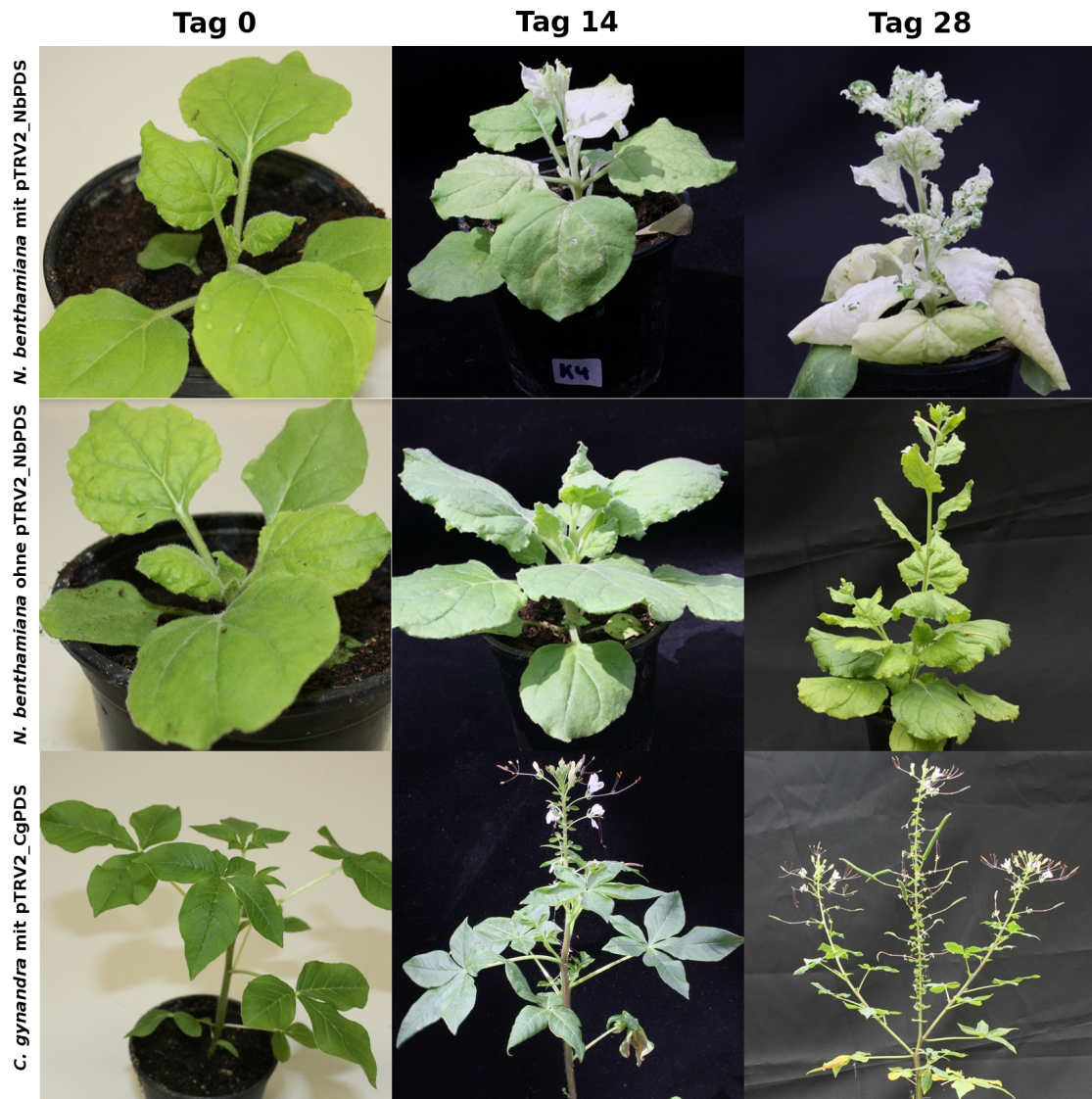
(A) PCR auf cDNA von *C. gynandra* (Cg) und *C. spinosa* (Cs). Als Marker wurde Hyperladder I (Bioline) verwendet. (B) Restriktionsabbau von pTRV2\_CgPDS (Cg) und pTRV2\_CsPDS (Cs). Es wurde das unabgebaute Plasmid (U) sowie der Abbau mit KpnI (K), mit XhoI (X) sowie mit beiden Enzymen (KX) aufgetragen. Als Marker wurde Hyperladder I (Bioline) verwendet. (C) Kolonie-PCR auf jeweils zwei Agrobakterienkolonien die mit pTRV2\_CgPDS (Cg (1 & 2)) sowie pTRV2\_CsPDS (Cs (3 & 4)) transformiert wurden. Parallel wurde eine technische Kontrolle mit pTRV2\_CgPDS in *E. coli* (+) sowie ohne DNA (-) durchgeführt. Als Marker wurde Hyperladder I (Bioline) verwendet.

### 3.7.3 VIGS Durchführung

Das VIGS wurde durch Injektion von Agrobakterien-Lösung mit den entsprechenden Konstrukten ausgelöst. Der VIGS-Effekt nach 0, 14 und 28 Tagen auf die Pflanzen ist in Abbildung 3.21 (auf der folgenden Seite) zu sehen. Während sich die *N. benthamiana* Kontrollpflanze mit pTRV2\_NbPDS wie erwartet in bereits bestehenden und neu entstehenden Blättern entfärbt, zeigt die Kontrollpflanze *N. benthamiana* mit einem pTRV2

ohne Phytoendesaturasesequenz keine Entfärbung.

Bei keiner der Cleome Pflanzen konnte eine Entfärbung festgestellt werden, die auf einen “knock-down” der PDS in Cleome schließen ließe.

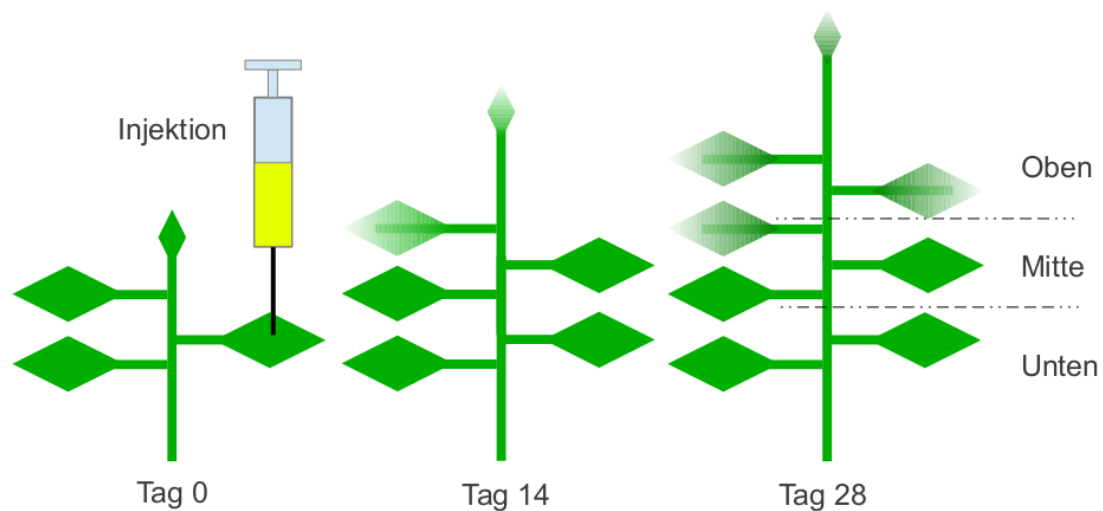


**Abbildung (3.21) VIGS Effekt**

VIGS Effekt auf 21 Tage alte Pflanzen; **Spalten von links nach rechts:** Nach 0, 14, 28 Tagen; **Zeilen von oben nach unten:** *N. benthamiana* mit pTRV2\_NbPDS sowie mit pTRV1; *N. benthamiana* ohne pTRV2\_NbPDS aber mit pTRV1; *C. gynandra* mit pTRV2\_CgPDS sowie mit pTRV1.

### 3.7.4 VIGS Nachweis

Um einen Nachweis zu erbringen ob sich pTRV1 & 2 zur Infektion in *C. gynandra* eignen, sollte die Verbreitung des Virenerbgutes innerhalb der Pflanzen überprüft werden. Obwohl kein Effekt auf die PDS durch das VIGS optisch wahrnehmbar war, müsste bei einer erfolgreichen Infektion die Verbreitung der Viren in neu entstandenen Blättern nachzuweisen sein. Es wurde Pflanzenmaterial von den verwendeten Pflanzen gesammelt. Am Tag 28 wurden Proben von den *Cleome* Pflanzen genommen (siehe Abbildung 3.22), "gepoolt" und RNS isoliert. Als Kontrolle wurde RNS von der *N. benthamiana*, die mit pTRV1 sowie pTRV2\_NbPDS infiziert wurde und eine Entfärbung zeigte, verwendet. Mittels der RNS wurde durch reverser Transkriptase und Oligo-dT Primern Einzelstrang-cDNA erstellt, die zum Nachweis dienen sollte. Von diesen Pflanzen wurden nur die oberen Blätter verwendet die erst zwischen Tag 14 und 28 neu entstanden waren. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass ein Nachweis nur mit neu entstandenem Pflanzengewebe erfolgte welches nicht mit den transformierten Agrobakterien in Berührung gekommen war.



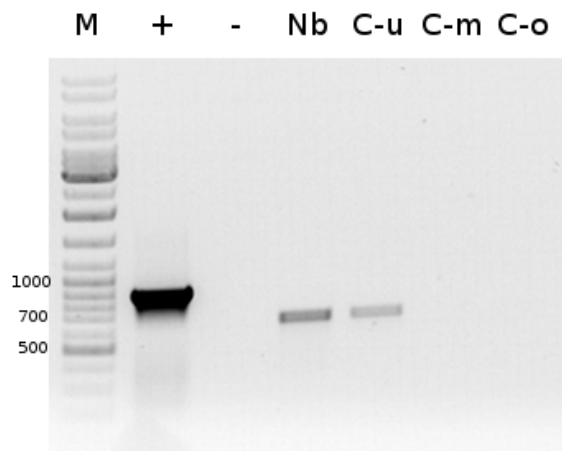
**Abbildung (3.22) Isolation von Pflanzenmaterial**

Die Isolation von Pflanzenmaterial erfolgte am 28. Tag nach der Infektion mit *A. tumefaciens*. Hierzu wurden alle Blätter die nach dem 14. Tag neu entstanden waren (**Oben**), dann die Blätter die seit der Infektion bis zum 14. Tag entstanden (**Mitte**), sowie zuletzt alle Blätter die bei der Infektion bereits vorhanden waren (**Unten**) isoliert. Die Blätter wurden sofort in flüssiges Stickstoff gegeben und bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Um zu überprüfen ob es zu einer Verbreitung des TRV innerhalb der Pflanze gekommen war, sollte die Anwesenheit des pTRV durch Nachweis von RNS1 überprüft werden. Da der TRV ein Einzelstrang-RNS Virus ist, wurde RNS isoliert und mittels reverser Transkriptase und oligo d(T)-Primern cDNA erstellt (wie in Liu et al. (2012)). Da sich die TRV RNS1 (von pTRV1) unabhängig von RNS2 (auf pTRV2) repliziert und systemisch ausbreitet (Liu et al. (2002b)), sollte die Infektion anhand der Sequenz des auf

RNS1 codierten “movement protein” nachgewiesen werden. Bei einem entsprechenden Ausbleiben des Nachweises, wäre die Infektion durch den TRV nicht erfolgreich.

Da pTRV1 notwendige Bedingung für ein Funktionieren des VIGS Effektes ist und der TRV ein Einzelstrang-RNS Virus ist, wurde RNS isoliert und mittels reverser Transkriptase und oligo d(T)-Primern cDNA erstellt (wie in Liu et al. (2012)). Da sich die TRV RNS1 (von pTRV1) unabhängig von RNS2 (auf pTRV2) repliziert und systemisch ausbreitet (Liu et al. (2002b)), sollte die Infektion anhand der Sequenz des auf RNS1 codierten “movement protein” nachgewiesen werden. Bei einem entsprechenden Ausbleiben des Nachweises, wäre die Infektion durch den TRV nicht erfolgreich. Hierzu wurde mittels TRV1-spezifischer Primer (Liu et al. (2012)) eine PCR auf die, aus isolierter RNS der Pflanzenproben erstellter cDNA, durchgeführt. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 3.23).



**Abbildung (3.23) Nachweis von pTRV1**

Agarose Gelelektrophorese, PCR mit Primern für die TRV1 Sequenzen. Als Template wurde die cDNA aus RNS aus gepoolten Pflanzenmaterial verwendet. Als Marker wurde der “Gene-Ruler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas)” (**M**) verwendet. Es wurde eine Kontrolle für das Funktionieren der PCR (+) sowie eine Kontrolle ohne DNA (-) durchgeführt. Als Template wurde cDNA aus RNS der oberen Blättern der drei infizierten *N. benthamiana* (**Nb**) sowie cDNA aus RNS von Blättern von zehn infizierten *C. gynandra* Pflanzen (**C**) verwendet. Bei den Proben von *Cleome* wurden die unteren mit Agrobakterien infizierten Blättern (**u**), mittlere Blätter die nicht infiziert wurden und bis Tag 14 gewachsen waren (**m**) sowie obere Blätter die erst nach Tag 14 der Infektion neu gewachsen waren (**o**) verwendet.

### 3.7.5 Zwischenergebnis

In den oberen Blättern der *N. benthamiana* konnte das Vorhandensein von des auf pTRV1 kodierten “movement protein” nachgewiesen werden. Ebenso war ein Nachweis möglich in den unteren Blättern der *C. gynandra* die mit mit pTRV1 und pTRV2\_CgPDS inkuliert worden waren. In den mittleren und oberen Blättern der *C. gynandra* konnte die Sequenz jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Infektion mit TRV scheint in *Cleome gynandra* nicht möglich zu sein. Der Nachweis in den unteren Blättern ist wohl auf die

dort vorhandenen Agrobakterien zurückzuführen. Möglicherweise liegt zwar mRNA des “movement proteins” vor, jedoch konnte keine Ausbreitung des Virus und damit kein VIGS nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Die Photosynthese stellt einen zentralen Prozess in Pflanzen dar. Ziel der Arbeit war, das Aquaporin CgPIP1;2 zu charakterisieren und die Rolle, die dieses Protein möglicherweise in der C4-Photosynthese von *C. gynandra* spielt, aufzuklären. Hierzu sollte auch der Vergleich zum homologen Aquaporin CsPIP1;2 aus *C. spinosa* (einer C3-Pflanze) dienen. Es mussten diverse Fragen und Vorbedingungen, die sich in diesem Zusammenhang stellen, gelöst werden.

### 4.1 Kultivierung von *Cleome gynandra*

Eine erfolgreiche Samenkeimung von *C. gynandra* war Vorbedingung für eine Reihe von Experimenten. Insbesondere mussten Bedingungen ermittelt werden, die zu einer reproduzierbaren und hohen Keimungsrate führen. Mehrere Versuche, die Samen, bei verschiedensten Bedingungen, direkt auf Erde auszusähen waren bis dahin nicht erfolgreich. Wie in Abbildung 3.1 auf Seite 21 (Grafik A) zu sehen, führt eine konstante Keimungstemperatur von 30 °C zu einer signifikant erhöhten Keimungsrate (von 70 %) verglichen mit einer Keimungstemperatur von 24 °C (30 %). Dies dürfte auf eine erhöhte Aktivität der für die Samenkeimung verantwortlichen Enzyme durch die erhöhte Temperatur zurückzuführen sein. Wie von Ekpong (2009) gezeigt, hat eine 8-stündige Lichteinstrahlung keine inhibitorische Wirkung auf die Samenkeimung. Da die Keimung im Dunkeln durchgeführt wurde, ist sie damit unabhängig vom Vorliegen einer Lichteinstrahlung auf die Keimlinge.

Desweiteren sollte überprüft werden, ob eine Steigerung der Keimungsrate von frisch geernteten Samenkapseln mittels Wärmeverbehandlung der Samen (bei 40 °C für 5 Tage) möglich war. Hierbei sollte die von Ekpong (2009) beschriebene Dormanz der Samen, von ein bis drei Monaten nach Ernte, durchbrochen werden. Auf diese Weise sollte die Zeit zwischen den Generationen von Pflanzen verkürzt und ausreichend Samenmaterial für Folgeexperimente erzeugt werden. Nach einer entsprechenden Wärmebehandlung sollte die Samenkeimung frisch geernteter Samen (77 % bei Ekpong) verglichen mit unbehandelten Samen (1,5 % bei Ekpong) deutlich erhöht sein. Eine entsprechende Erhöhung wurde jedoch nicht beobachtet (Abbildung 3.1 auf Seite 21 Grafik (B)). Die Keimungsrate war im Gegenteil bei der nicht behandelten Kontrolle signifikant höher (84 % verglichen mit 20 % bei den nicht behandelten Samen). Eine Dormanz der Samen war bei Verwendung frisch geernteter Samen nicht zu beobachten. Möglicherweise tritt die Dormanz bei einer konstanten Keimungstemperatur von 30 °C nicht auf, da optimale Temperaturbedingungen für die Keimungsenzyme geschaffen werden. Es ist zu berücksichtigen, dass bei Ekpong (2009) die Keimungsbedingungen in der Ubon Ratchatani Provinz, Thailand,



im November nachgestellt werden sollten. Also das Oszillieren der Temperatur und des Lichteinfalls (20 °C, 16 h im Dunkeln, 30 °C, 8 h bei Licht). Die in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen sollten jedoch eine optimale Keimung unter Laborbedingungen herstellen. Da die Samen mehrerer Samenkapseln gemischt und für beide Experimente eingesetzt wurden, kann das Ausbleiben einer Dormanz nicht auf einen Unterschied im Saatgut zurückzuführen sein.

Weiterhin scheint bei den gewählten Bedingungen eine Vorbehandlung die Keimungseffizienz zu reduzieren (Samenkeimung behandelter Samen 20 %). Warum eine Vorbehandlung der Samen bei den verwendeten Keimungsbedingungen zu einem Abfall der Keimungseffizienz führt ist schwer zu erklären. Möglicherweise spielen hierbei mehrere noch unbekannte Faktoren eine Rolle, die in den verschiedenen experimentellen Rahmenbedingungen zusammenwirken. Bei Ekpong (2009) führen auch Bedingungen wie ein Wässern der Samen (dort: Keimungseffizienz 74 %) oder Stratifizieren für einen Tag (dort: Keimungseffizienz 65 %) zu einer Veränderung des Keimungsverhaltens frisch geernteter Samen. Somit scheinen verschiedenste Bedingungen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (dort: Keimungseffizienz 1,5 %) zu einer Veränderung im Keimungsverhalten zu führen. Ob diese Behandlungen ursächlich für eine Veränderung im Keimungsverhalten sind oder im Grunde nur die typische Keimungseffizienz bei der Verwendung frisch geernteter Samen ist, wäre zu prüfen. Der Frage, ob Temperaturen höher als 50 °C zu einer noch stärkeren Verringerung der Keimungseffizienz führen, wurde nicht nachgegangen.

Da im vorliegenden Fall nur eine möglichst hohe Keimungseffizienz erreicht werden sollte, wurde im Folgenden auf eine Vorbehandlung der Samen verzichtet.

Um zu überprüfen, ob eine direkte Anzucht der Samen auf MS-Agar möglich ist, wurde Keimungsverhalten auf diesem Medium überprüft (Abbildung 3.1 auf Seite 21 Grafik C). Dieser Versuch wurde parallel zum Versuch der Wärmeverbehandlung der Samen durchgeführt. Die Keimungsraten waren mit 2 % (ohne Wärmebehandlung) und 4 % (mit Wärmebehandlung) sehr gering. Da es bei Ekpong (2009) zu einer geringeren Keimungseffizienz (Samenkeimung 20 % verglichen mit anderen Methoden) beim Vorhandensein von  $\text{KNO}_3$  kam, wirkt sich dieses wohl negativ auf die Keimung aus. Der Frage, ob dies ein direkter Effekt des Kaliumnitrats ist oder nur eine pH-Sensitivität der Samen widerspiegelt, wurde in dieser Arbeit nicht nachgegangen. Gekeimte Samen konnten problemlos auf MS-Agar überführt und weiter kultiviert werden. Der Effekt scheint sich somit auf die Keimung zu beschränken. Eine Keimung direkt auf MS-Agar wurde wegen der geringen Keimungseffizienz nicht weiter durchgeführt.

Durch Ermittlung günstiger Keimungsbedingungen sowie Anzuchtbedingungen, die gesunde Pflanzen hervorbrachten, war die Grundlage für weitere experimentelle Betrachtungen der *Cleome* gelegt.

## 4.2 Physiologische Charakterisierung von *Cleome gynandra* und *Cleome spinosa* mittels Gaswechselanalyse

Um zu überprüfen, ob die Charakterisierung des Photosynthesotyps von *C. gynandra* und *C. spinosa* mittels biochemischer und histologischer Methoden (Bräutigam et al. (2011); Marshall et al. (2007)) zutrifft, wurde über Gaswechsel eine entsprechende Charakterisierung durchgeführt. Eine Untersuchung von Marshall et al. (2007) beschränkte sich bislang auf die Beschreibung des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes sowie der Carboxylierungseffizienz. Diese Werte unterstützen den biochemischen und histologischen Befund, dass es sich bei *C. gynandra* um eine C4- und bei *C. spinosa* um eine C3-Pflanze handelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die physiologischen Reaktionen der Pflanzen, die im Vergleich zueinander und auch für sich alleine eine entsprechende Zuweisung zulassen, untersucht. Insbesondere sollten Bedingungen überprüft werden, bei denen der Vorteil einer möglichen C4-Pflanze bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen befördert oder auch nivelliert wird.

In Abhängigkeit von Lichtintensität und der CO<sub>2</sub>-Konzentration ändert sich die Assimilationsrate von CO<sub>2</sub> der untersuchten Pflanzen. Die Erhöhung der Lichtintensität führt dabei in der Regel zu einer Erhöhung der Assimilationsrate bis zu einem Maximalwert, danach kann eine inhibitorische Wirkung eintreten. Die Assimilationsrate ist hierbei abhängig von Parametern, wie zum Beispiel der dem Aufbau und der Leistung des Photosyntheseapparates der Pflanze, Wasserhaushalt und Temperatur (Atwell et al. (1999)). Bei einer vergleichenden Messung einer C3- und C4-Pflanze würde man bei ambienter CO<sub>2</sub>-Konzentration für höhere Lichtintensitäten auch grundsätzlich eine höhere Assimilationsrate der C4-Pflanze (verglichen mit der C3-Pflanze) erwarten. Dies entspricht der vorliegenden Messung (Abbildung 3.3 auf Seite 25). Hier ist ab 500 bis 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen eine signifikant höhere Assimilationsrate bei den untersuchten *C. gynandra* zu beobachten. Die Assimilationsrate beträgt hierbei (ab 750  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen) das 1,5- bis 1,7-fache verglichen mit den untersuchten *C. spinosa*.

Um vergleichbare Parameter der Messungen zu bestimmen, wurde eine Auswertung mit der Mitscherlich Gleichung (Gleichung 1 auf Seite 26) verwendet. Diese Gleichung wird benutzt, um die Reaktion der Pflanze auf Dünger in Beziehung zu setzen. Das Argument dahinter ist, dass z.B. atmosphärisches CO<sub>2</sub> (Potvin und Lechowicz (1990)) oder auch Licht als "Dünger" in der Photosynthese dienen. Auf diese Weise werden ökophysiologische Antwortkurven auf Konzentrationsänderungen verschiedener Parameter entwickelt. Aus den Antwortkurven lassen sich wiederum verschiedene Kennwerte für das entsprechende Experiment ermitteln. Eine Kurvenanpassung über die Mitscherlich Gleichung ergab, dass der Maximalwert der Assimilation ( $A_{\text{max}}$ ) der untersuchten *C. gynandra* 1,9-fach höher als der von *C. spinosa* war. Die Werte von  $A_{\text{max}}$ , AQE und LCP waren nicht signifikant unterschiedlich. Dies ist wahrscheinlich auf die kleine Probengröße von jeweils drei Pflanzen zurückzuführen. Insbesondere beim LCP wäre durch den geringen zu erwartenden Unterschied im absoluten Wert eine höhere Probenanzahl angeraten gewesen.

Eine weitere Möglichkeit, den LCP zu ermitteln, ergibt sich durch das Anlegen einer Regressionsgeraden. Hierbei wird im linearen Teil der Lichtkurve (im Bereich geringer Messlichtintensität) der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse ermittelt. Dieser gibt den Wert wieder, bei dem das durch Atmung entstehende und bei der Assimilation verbrauchte CO<sub>2</sub> einander entsprechen. Die auf diese Weise ermittelten Werte waren, mit der durch die Mitscherlich-Gleichung ermittelten Werte, vergleichbar. Der LCP betrug bei *C. spinosa* 73,7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nach Ermittlung des Schnittpunktes der Regressionsgeraden. Nach Auswertung der Mitscherlich-Gleichung ergab sich ein Wert von 74,38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Bei *C. gynandra* betrug der LCP nach Berechnung des Schnittpunktes 91,8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und nach Auswertung der Mitscherlich-Gleichung 93,72  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In beiden konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Pflanzen festgestellt werden. Dies kann sich, wie bereits beschrieben, aus einer zu geringe Probengröße bei einem in Relation kleinen Unterschied im Durchschnittswert und einer grossen Varianz innerhalb einer Probengruppe ergeben.

Alleine die signifikant höheren Assimilationsraten der untersuchten *C. gynandra* im Bereich von 500 bis 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen spricht für eine Adaption dieser Pflanze an Standorten mit hoher Lichtintensität. Damit ist ein Merkmal einer C4-Pflanze bei den untersuchten *C. gynandra* gegeben.

Es musste ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den Pflanzen auf - für eine Spezies - ungünstige Umweltbedingungen bei Anzucht und Messung beruhen. Hierfür sollten die bei den vorangegangenen Messungen parallel ermittelten Werte für die Elektronentransportrate (ETR) sowie die Quantenausbeute (eng.: quantum yield) zwischen den biologischen Replikaten der Pflanzen verglichen werden. Sollten diese voneinander signifikant abweichen, hätten diese Unterschiede in Quantenausbeute und ETR auch Auswirkung auf die Assimilationsrate der Pflanzen. Wie in Abbildung 3.5 auf Seite 29 zu sehen, ist die Lichtintensität jeweils aufgetragen gegen die Quantenausbeute und die ETR für beide Pflanzenarten. Die Mittelwerte der Quantenausbeute und der ETR weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Pflanzen auf. Dies legt nahe dass keine ungünstigen Umweltbedingungen bei Anzucht und Messungen vorlagen, die zu einer Verzerrung der Messergebnisse führen.

Als weiteres Experiment wurden die Assimilationsraten bei konstanter Lichtintensität (1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Photonen) und variierender CO<sub>2</sub>-Konzentration bestimmt. Die Messung der Assimilationsraten bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen führten zu einem signifikanten Unterschied im Bereich von 70 ppm bis 375 ppm. Dies zeigt, dass *C. gynandra* eine deutliche Anpassung an eine niedrige CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit aufweist. Bei einer Auswertung der Werte, ermittelt durch Anpassung an die Mitscherlich-Gleichung, zeigt sich ein hoch signifikanter ( $p < 0,001$ , two-tailed t-Test) Unterschied im CO<sub>2</sub>-Kompensationspunkt (CCP). Dieser signifikante geringere CCP bei *C. gynandra* spricht für deren Einordnung als Pflanze mit C4-Photosynthese.

Der lineare Teil der Kurvenanpassung (Der Auftragung von C<sub>a</sub> gegen A<sub>N</sub>), dessen Steigung durch A<sub>qe</sub> gegeben ist, spiegelt in C4-Pflanzen die Carboxylierungseffizienz wieder (Marshall et al. (2007)). Diese Steigung ist üblicherweise größer, verglichen mit C3-

Pflanzen, da bei physiologischem pH das  $\text{HCO}_3^-$  schneller durch die PEPC verarbeitet wird als das  $\text{CO}_2$  durch Rubisco (Yin et al. (2011)). Der ermittelte Unterschied zwischen den verwendeten Pflanzenarten war aber nach einem two-tailed t-Test ( $p = 0,055$ ) nicht signifikant.

Um einen weiteren Beleg für eine Charakterisierung der *Cleome* mittels Gaswechsel zu liefern, wurden Lichtkurven bei 750 ppm  $\text{CO}_2$  durchgeführt. Durch eine hohe  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 750 ppm werden die Vorteile der C4-Pflanze aufgehoben. Bei dieser Konzentration im Außenmedium ist Photorespiration bei den *Cleome* bei den gegebenen Versuchsbedingungen nur zu einem sehr geringen Anteil gegeben. Bei einer Michaelis-Menten Konstante der Rubisco für  $\text{CO}_2$  ( $K_C$ ) von 650  $\mu\text{bar}$  sowie für  $\text{O}_2$  ( $K_O$ ) von 450 mbar (bei 25 °C) nach Sage et al. (1999) (Seite 184) wird die Rubisco bevorzugt  $\text{CO}_2$  als Substrat verwenden. Bei den hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von 750 ppm, die über  $K_C$  liegen, wird das  $\text{CO}_2$  nicht zum limitierenden Element für die Assimilationsrate und die Rate der Photorespiration wird extrem verringert. Wenn die  $\text{CO}_2$ -Konzentration nun nicht mehr limitierend ist, wird der Vorteil, den der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus der C4-Photosynthese darstellt, kleiner bzw. nicht mehr gegeben sein. Es werden andere Faktoren, wie das Funktionieren des Photosyntheseapparates oder eine Unterdrückung der Photorespiration, bestimmend. Bei dem entsprechend durchgeführten Experiment sind keine signifikanten Unterschiede der Assimilationsrate bei hohen Lichtintensitäten zwischen den *Cleome* gegeben. Dies stellt keinen Beleg dar, dass die Pflanzen sich gleich verhalten. Festgehalten werden kann aber, dass bei 750 ppm Assimilationsraten beider Pflanzen vorliegen, die sich bei hohen Lichtintensitäten nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden. Dies ist im Gegensatz zu ambienten Bedingungen (390 ppm) zu sehen.

Der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsmechanismus der C4-Photosynthese führt nur bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen zu einer Erhöhung der Assimilationsrate. Bei hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen wird dieser Vorteil aufgehoben. Die C3-Photosynthese kann dann bei höheren  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen relativ höhere Assimilationsraten aufweisen.

Es kann aufgrund der Gaswechseldaten der Schluss gezogen werden, dass *C. gynandra* eine C4-Pflanze ist. Die gemessenen biologischen Replikate zeigen die Merkmale, die man im Vergleich mit einer C3-Pflanze erwarten würde. Es sind signifikant höhere Assimilationsraten bei 390 ppm  $\text{CO}_2$  und ansteigender Lichtintensität zu beobachten (Abbildung 3.3 auf Seite 25). Weiterhin zeigt sie signifikant höhere Assimilationsraten bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (Abbildung 3.6 auf Seite 31). Diese Merkmale sprechen schon für eine C4-Photosynthese bei *C. gynandra*. Weiterhin sieht man (Abbildung 3.7 auf Seite 33), dass kein signifikanter Unterschied in den Assimilationsraten der beiden Pflanzenarten bei 750 ppm  $\text{CO}_2$  besteht. Dies zeigt, dass ein Vorteil bei der Assimilation von *C. gynandra* bei hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen nicht mehr gegeben ist. Der Vorteil einer Aufteilung in primäre und sekundäre  $\text{CO}_2$ -Fixierung ist bei hohen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen nicht gegeben. Die Aktivität der Rubisco ist nur ein limitierender Faktor bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen (Long und Bernacchi (2003)). Ein  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsmechanismus, wie er in der C4-Photosynthese vorliegt, führt

bei hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nicht zu einer höheren Assimilationsrate. Die Nachteile, die sich durch die enzymatische Umsetzung und den Transport des Kohlenstoffs aus dem CO<sub>2</sub> in der C4-Photosynthese ergeben, führen zu vergleichbaren Assimilationsraten der C3-Photosynthese von *C. spinosa*. Letztere kann im Vergleich zu ambienten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ihre Assimilationsrate deutlich steigern. Diese Steigerung wird auf den einfacheren Aufbau des photosynthetischen Gewebes im Vergleich zur C4-Photosynthese zurückzuführen sein. Aufgrund dieser Auswertung wird der Schluss gezogen, dass es sich bei *C. gynandra* um eine C4- und bei *C. spinosa* um eine C3-Pflanze handelt.

### 4.3 Expressionslevel der Transkripte von CgPIP1;2 und CsPIP1;2

Durch die Erleichterung der Diffusion von CO<sub>2</sub> über die Plasmamembran spielen Aquaporine eine Rolle in der C3-Photosynthese. So zeigt *A. thaliana*, bei denen AtPIP1;2 nicht funktional vorliegt, eine Reduktion der Photosyntheserate (Heckwolf (2010)). Die Rolle, die Aquaporine in der C4-Photosynthese spielen, ist bisher noch nicht geklärt. Unterschiede in der Expression eines möglicherweise CO<sub>2</sub>-leitenden Aquaporins könnten auf eine besondere Rolle in diesem Photosynthesetypen zurückzuführen sein. Dies wäre insbesondere der Fall wenn dieser quantitative Unterschied in der Expression zwischen Pflanzen mit C3- und C4-Photosynthese festzustellen ist.

Die mit CgPIP1;2 korrespondierende Bande zeigte eine ca. 10-fach erhöhte Signalstärke verglichen mit der Bande, die mit CsPIP1;2 korrespondiert.

Ein quantitativer Northern Blot besitzt inhärent diverse Problematiken. Es handelt sich bei einem quantitativen Northern Blot um eine indirekte Methode. Es wird die Emission von Licht detektiert, die der Reaktion, der an den Dig-Antikörper gekoppelten Phosphatase mit dem einem Substrat (CDP-Star), nachfolgt. Dieses Signal ist damit von der Bindung der Sonden an die RNS, von der Bindung des Dig-Antikörpers an die Sonden sowie von der Aktivität des Enzyms abhängig. Aus den Signalstärken kann dabei grundsätzlich indirekt auf ein entsprechendes Expressionsniveau in Pflanzen geschlossen werden.

Der festgestellte ca. 10-fache Unterschied in der Expression deckt sich in ihrer Größenordnung mit den Ergebnissen von Bräutigam et al. (2011). Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete unterschiedliche Expression in 8-Wochen alten Pflanzen in der Entwicklung der Pflanze begründet ist und kein Zusammenhang zu den verschiedenen Photosyntheseapparaten vorliegt. Dies könnte aber durch Untersuchungen an unterschiedlich altem Pflanzenmaterial und einer Erhöhung der Anzahl der Experimente ausgeglichen werden.

Da die beiden Aquaporingene unterschiedlich exprimiert werden und die Aktivität von Enzymen und Transportproteinen zumindest teilweise auf der Ebene der Transkripthäufigkeit kontrolliert wird (Bräutigam et al. (2011)), ist ein Zusammenhang von Aquaporin zum Photosynthesetyp möglich. Natürlich können pleiotrope kompensatorische Änderungen der Transkriptniveau, die durch ein anderes Gen ausgelöst werden, nicht ausgeschlossen werden.

## 4.4 Analyse der Unterschiede in der Aminosäuresequenz

Wie bereits gezeigt, liegt bei den untersuchten Proben von acht Wochen alten *C. gynandra* und *C. spinosa* eine unterschiedlich starke Expression von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 vor. Dieser Unterschied in der Expression wird nur dann eine Rolle im Vergleich der Photosynthesetypen spielen, solange es sich um homologe Proteine handelt. Ein Sequenzvergleich zwischen CgPIP1;2 zu CsPIP1;2 spricht für eine Homologie beider Proteine. Ein Sequenzvergleich mittels des Programmes LAlign ergab eine 97,9 %-ige Identität in der Aminosäuresequenz (286 Aminosäuren) bei einem E-Wert von  $2.6e-184$ . Diese Werte sprechen für eine Homologie der Proteine.

Die Unterschiede in der Sequenz liegen in sechs Aminosäuren. Nach Berechnung mittels des Programmes SOSUI befinden sich drei innerhalb von Transmembranhelices. Drei weitere befinden sich in Schleife C (Abbildungen 2.3 auf Seite 16 und 3.11 auf Seite 40). Hier würden sich Unterschiede, die sich in der Funktionalität niederschlagen, durch eine Veränderung der Leitfähigkeit zeigen. Hypothetisch möglich wären auch Auswirkungen auf die Lokalisation durch die Unterschiede in der Aminosäuresequenz. So zeigten Brown et al. (2011), dass die Lokalisierung von Proteinen wie der NADME1 innerhalb der Bündelscheidenzellen von *C. gynandra* unabhängig vom verwendeten Promotor ist. Orthologe Gene aus C3 Pflanzen, exprimiert unter einem 35S-Promotor, zeigen eine entsprechende Expression bevorzugt in den Bündelscheidenzellen.

Die Sequenzunterschiede in den Aquaporinen könnten auch eine Veränderung in der Bildung von Aquaporintetrameren hervorrufen. So wurde gezeigt, dass die Bildung von Heterotetrameren verschiedener Aquaporine möglich ist (Sdorra (2009)). Diese Heterotetramisierung wiederum kann zu einer Veränderung in den Eigenschaften einer Membran führen. In den folgenden funktionellen Tests sollte geklärt werden, welche Funktionen CgPIP1;2 und CsPIP1;2 in der Pflanze erfüllen.

## 4.5 Funktionelle Analyse der Aquaporine

Die funktionelle Analyse erfolgte mittels Stopped-Flow Spektrometrie im heterologen Expressionsmodell Hefe (*S. cerevisiae*). Die Expression eines wasserleitenden Aquaporins sollte zu einer Erleichterung der Diffusion von Wasser durch die Membran der Hefeprotoplasten führen. Eine fehlende Expression bzw. die Expression eines Proteins, das nicht zu einer Erleichterung der Diffusion führt, sollte eine deutlich verlangsamte Diffusion über die Membran der Hefeprotoplasten führen. Die Diffusion kann indirekt über das Schwellen der Protoplasten beobachtet werden, welches zu einer Veränderung des beobachteten Signals führt.

Das Aquaporin aus *Nicotiana tabacum* NtPIP2;1 sorgt für eine Erleichterung der Diffusion von  $H_2O$  über die Membran (Fischer (2007)). Es diente in den Versuchen als Vergleich für ein wasserleitendes Aquaporin. Eine mit NtPIP2;1 vergleichbare Wasserleitfähigkeit bei den Aquaporinen der *Cleome* konnte nicht festgestellt werden. Die *Cleome* Aquaporine zeigen ein Verhalten vergleichbar mit der uninduzierten Kontrolle (siehe

Abbildung 3.13 auf Seite 44). Die ermittelten Werte für die Osmotische Permeabilität (Abbildung 3.4 auf Seite 47 und Tabelle 3.4 auf Seite 47) waren jeweils bezogen auf Nt-PIP2;1 signifikant ( $p < 0,001$ ) geringer. Gleichzeitig waren sie in einem Größenbereich vergleichbar mit der uninduzierten Kontrolle. Eine Wasserleitfähigkeit kann für die *Cleome* Aquaporine CgPIP1;2 und CsPIP1;2 hiermit verneint werden.

Als weitere Funktion lag eine Erleichterung der Diffusion von  $\text{CO}_2$  nahe. Das Aquaporin aus *Nicotiana tabacum* (NtAQP1) zeigt eine entsprechende Funktion (Uehlein et al. (2003)). Ein Homologievergleich mit NtAQP1 weist mit einem “E-Value” von  $5.4 \cdot 10^{-168}$  eine hohe Ähnlichkeit zu CgPIP1;2 auf Sequenzebene auf. Ebenso ein Aquaporin aus *Arabidopsis thaliana* AthPIP1;2, das eine solche Funktion zeigt (Heckwolf (2010) und Uehlein et al. (2012)). Hierbei ist eine Homologie zu CgPIP1;2 bei einem “E-Value” von  $1.3 \cdot 10^{-158}$  zu bejahen.

Bei den Stopped-Flow-Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden Hefen verwendet, die sowohl das Aquaporin als auch Carboanhydrase induzierbar exprimieren. Diese wurden mit dem Farbstoff Fluoreszein Diacetat (FDA) “beladen”, in einem  $\text{CO}_2$ -haltigen Puffer in der Stopped-Flow-Apparatur gemischt und die Abnahme der Fluoreszenz gemessen (siehe Abbildung 3.15 auf Seite 49). Die mittels der gemessenen Kinetiken ermittelten Permeabilitätskoeffizienten (Abbildung 3.16 auf Seite 51 und Tabelle 3.5 auf Seite 52) ergaben einen signifikanten Unterschied zu NtPIP2;1 3-Helix. Hierbei erleichtert NtPIP2;1 3-Helix die  $\text{CO}_2$ -Diffusion über die Membran nicht oder nur verringert (Pede (2008)). Die Aquaporine CgPIP1;2, CsPIP1;2 und NtAQP1 zeigen jeweils eine signifikant höhere Leitfähigkeit verglichen mit NtPIP2;1 3-Helix. Letzteres ist hierbei als Vergleich für ein Membranprotein zu sehen, dass zu keiner Erleichterung der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität der Membran führt. Alle drei Aquaporine führen zu einer vergleichbaren Permeabilität der Hefen für  $\text{CO}_2$ . Somit kann qualitativ die Aussage getroffen werden, dass die untersuchten *Cleome* Aquaporine zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran für  $\text{CO}_2$  führen.

Da sich die veröffentlichten Werte der  $\text{CO}_2$ -Permeabilität verschiedener Membranen in vier Größenordnungen unterscheiden (Evans et al. (2009)), wird von einer starken Abhängigkeit von der Messmethodik bei der Quantifizierung ausgegangen. Dies ist ein Argument für die rein qualitative Betrachtung der Funktion der Aquaporine. Die quantitative Aussage über die in Tabelle 3.5 auf Seite 52 gezeigten  $P_{\text{CO}_2}$ -Werte nach der Methode von Yang et al. (2000) besitzt inhärente Problematiken. So konnte bei den Messungen kein ratiometrischer Farbstoff verwendet werden, da dieser einen zweiten Photomultiplier vorausgesetzt hätte. Die durchgeführten OD-Messungen, die einen Anhaltspunkt über die Beladung der Zellen vor der Messung in der Stopped-Flow durchgeführt wurden, geben nur einen groben Anhaltspunkt für die Konzentration des Farbstoffes in den Zellen. Eine interne Beladungskontrolle wäre aber nur bei einem ratiometrischen Farbstoff möglich. Bei unterschiedlichen Konzentrationen des Farbstoffs ist das Signal-Rausch-Verhältnis auch unterschiedlich. Dieses kann bei geringen Konzentrationen des Farbstoffes zu einem extremen Abweichen des Fits mittels der Gleichung 3 auf Seite 45 führen. Insbesondere

bei der Verwendung von sehr engen Zeitfenstern, die über den der Fit angelegt werden, kann es zu Kurvenanpassungen kommen, die den Verlauf der Messpunkte nicht mehr wiedergibt. Da aber gerade die Krümmung des Anfangsteils der Kurve zur Reaktionskonstante beiträgt, kann dies zu einer Verfälschung der resultierenden Permeabilitäten führen. Für eine Bestimmung eines absoluten  $P_{CO_2}$ -Wertes war zusätzlich noch die Bestimmung der Konzentration der Membranproteine sowie die Konzentration der Aquaporine in den Hefenmembranen notwendig. Ebenso wäre für eine quantitative Betrachtung der Leitfähigkeit eine Bestimmung der Konzentration der Carboanhydrase und deren Aktivität notwendig. Mangels entsprechender Antikörper konnten eine entsprechende Nachweise nicht geführt werden. Diese Arbeit beschränkt sich damit auf eine rein qualitative Feststellung über die Funktion der Aquaporine.

Zum Teil wird bezweifelt, dass die  $CO_2$ -Diffusion durch Membranproteine erleichtert wird. Es wird argumentiert, dass das  $CO_2$ , entsprechend der Regel von Overton, direkt über die Membran diffundiert (Missner et al. (2008)). Diese Befunde auf Pflanzenmembranen zu übertragen ist problematisch. Hiergegen spricht, dass entsprechende experimentelle Belege keine native Membran zum Objekt hatten und das physiologische Auswirkungen bei der Messung an nativen Membranen in Pflanzengewebe beobachtbar sind (Uehlein et al. (2012)). Insbesondere in C3-Pflanzen sollen Aquaporine einen Beitrag an der Mesophyllleitfähigkeit haben, sowohl in der Plasmamembran als auch in der Chloroplastenhülle (Evans et al. (2009)).

Abschließend kann festgestellt werden, dass rein qualitativ CgPIP1;2 sowie CsPIP1;2 die Leitfähigkeit von Hefemembranen für  $CO_2$  verändert. Hierbei wird die Leitfähigkeit vergleichbar mit dem als  $CO_2$ -leitend beschriebenen NtAQP1 erhöht. Die untersuchten Aquaporine aus *Cleome* können damit eine Rolle in der Photosynthese spielen.

## 4.6 Lokalisation von CgPIP1;2 mittels fluoreszierendem Fusionsprotein

Wegen der Homologie von CsPIP1;2 zu NtAQP1 kann eine ähnliche Rolle beider Aquaporine in der C3-Photosynthese vermutet werden. Da für NtAQP1 sowohl ein Nachweis in der Plasmamembran (Siefritz et al. (2001)) als auch der inneren Chloroplasten Membran (Uehlein et al. (2008)) vorliegt, wäre eine entsprechende Lokalisierung von CsPIP1;2 in *C. spinosa* wahrscheinlich.

Die Rolle von CgPIP1;2 für die C4-Photosynthese wird sich aus ihrer Lokalisierung ergeben. Als "Plasmamembran Intrinsisches Protein" (PIP) ist eine ebensolche Lokalisierung in der Plasmamembran möglich. Die starke Ansammlung von Chloroplasten in den Bündelscheidenzellen sowie die auftretende räumliche Nähe dieser Chloroplasten zu den Mitochondrien der Bündelscheidenzellen (Marshall et al. (2007)) lässt auch ein Vorkommen dieser Aquaporine in den Chloroplastenmembranen und in den Membranen der Mitochondrien vermuten. In der NAD-ME C4-Photosynthese muss  $CO_2$  sowohl die Plasmamembran der Mesophyllzellen als auch Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten in den Bündelscheidenzellen überqueren.



Einen erster Anhaltspunkt für eine Lokalisation von CgPIP1;2 in der Plasmamembran soll die Transfektion von Zwiebelzellschuppzellen mit GFP gekoppeltem CgPIP1;2 liefern. Die Vorteile dieses Systems sind die leichte Transfizierbarkeit der relativ großen Zellen sowie das Fehlen einer Chlorophyll-Fluoreszenz, die das Identifizieren bei den vorhandenen Filtern erschwert hätte. Wie in Abbildung 3.17 auf Seite 53 zu sehen, ergab die Transfektion mit cytosolischem GFP mittels “biolistic bombardement” ein diffuses Signal über die ganze Zwiebelzelle hinweg. Im Vergleich dazu zeigt die Transfektion mit einem GFP-gekoppelten CgPIP1;2 eine Kolokalisation mit der Zellwand der Zwiebelzelle. Da die Plasmamembran bei einer turgeszenten Zelle in unmittelbarer Nähe der Zellwand ist, kann man von einem ersten Anhaltspunkt für eine Lokalisation von CgPIP1;2 in der Plasmamembran ausgehen. Eine Plasmolyse wie bei Fileschi (2008) wurde nicht durchgeführt. Bei dieser Methodik kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aquaporine auch in der Membran des Tonoplasten vorliegen. Dieser erste Anhaltspunkt für eine Lokalisation in der Plasmamembran wäre mit weiteren Experimenten mit Plasmamembranmarkern oder Plasmamembran spezifischen Farbstoffen abzusichern. Da üblicherweise für eine Lokalisation von Fluoreszenzproteingekoppelten Proteinen in der Plasmamembran PIPs herangezogen werden, wäre die Wahl eines Farbstoffes vorzuziehen. Dadurch könnten Effekte wie eine Interaktion der Aquaporine untereinander (wie sie nach Sdorra (2009) möglich wäre) vermieden werden. Weiterhin wären Lokalisationsstudien in Mitochondrien und Chloroplasten mittels entsprechender Organell-Markern angezeigt. Hierfür sollten stabil-transformierte Zellen von *Cleome* verwendet werden, um die Lokalisation in der nativen Umgebung beobachten zu können.

Die NAD-ME typischen Anpassungen sprechen für einen Aufbau, der ideal ist für die Diffusion von CO<sub>2</sub> vom Ort der Decarboxylierung hin zum Verbraucher (PEPC sowie Rubisco). Das Vorkommen der PEPC in den Mesophyllzellen sorgt für eine rasche Umsetzung des CO<sub>2</sub>. Dies entspricht der beobachteten, mehr als 6-fach signifikant erhöhten Aktivität der PEPC in Blattmaterial aus *C. gynandra* verglichen mit *C. spinosa* (Bräutigam et al. (2011)). Die mögliche Lokalisation in der Plasmamembran von Pflanzenzellen von CgPIP1;2 legt eine Rolle des Aquaporins bei der primären Fixierung des CO<sub>2</sub> durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) nahe. Die Verringerung der CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit der Mesophyllzellen könnte einer optimalen primären Fixierung dienen. Dies könnte auch durch die Erleichterung der Diffusion zwischen Mitochondrium und Chloroplasten mittels Aquaporinen geschehen. Auch wenn das Modell von Sommer et al. (2012) zugrundegelegt wird, so kann die Diffusion über die Chloroplastenmembran eine größere Rolle spielen. Ein “Leakage”, also eine Diffusion des CO<sub>2</sub> aus den Bündelscheidenzellen, wird wahrscheinlich durch die (im Verhältnis zur Mesophyllzellen) 5-fach dickeren Zellwände (Koteyeva et al. (2011)) sowie durch die räumliche Nähe der Mitochondrien und Chloroplasten innerhalb des centripetalen Teils der Zellen (hin zu den Leitbündeln) verhindert. Auch die Tatsache, dass durch Immunohistologie nachgewiesen werden konnte, dass Rubisco alleine in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen von *C. gynandra* vorkommt (Marshall et al. (2007), Koteyeva et al. (2011)), lässt ein Vorkommen der Aquaporine in diesen Membranen vermuten.

Die durchgeführten ersten Versuche legen eine Lokalisation von CgPIP1;2 auf zellulärer

Ebene in der Plasmamembran der Zwiebelschuppenzellen nahe. Ob sich eine entsprechende Lokalisation auch im nativen System zeigt, wäre durch weitere Versuche zu klären. Insbesondere wäre eine Lokalisation auf Ebene der verschiedenen Zelltypen (Mesophyll- und Bündelscheidenzelle) sowie eine Lokalisation in den Organellen der verschiedenen Zelltypen interessant. Aus der Lokalisation könnten dann auf die mögliche Funktion von CgPIP1;2 in der C4-Photosynthese Rückschlüsse gezogen werden. Insbesondere ob die Pflanzen die Leitfähigkeit ihrer verschiedenen Membranen für CO<sub>2</sub> durch die Expression von CgPIP1;2 verändert und ob eine Veränderung dieser Expression Auswirkungen auf die C4-Photosynthese zeigt.

#### 4.7 “Virus Induced Gene Silencing” mit TRV

Eine Veränderung in der Expression von CgPIP1;2 hätte Auswirkungen auf die Assimilationsrate, wenn das Aquaporin eine Rolle in der C4-Photosynthese spielt. Daneben kommen noch pleiotrope Effekte in Frage. Um eine Herabregulierung der Expression durchzuführen, kommt das “Virus Induced Gene Silencing” mittels verschiedener Viren in Frage. Der “Tobacco Rattle Virus” (TRV) ist verwendbar bei *Arabidopsis* Burch-Smith et al. (2006). Der TRV besitzt ein relativ großes Wirtsspektrum, da er verschiedenste Pflanzenarten aus der Klasse der Magnoliopsida (Bedecktsamer) (wie *Solanum melongena*, *Aquilegia vulgaris*, *Papaver somniferum* (Liu et al. (2012))) infizieren kann. Da *Cleome* ebenso wie *Arabidopsis* Teil der Ordnung der Brassicales ist, lag eine Verwendbarkeit nahe.

Voraussetzungen für VIGS mittels TRV in *Cleome* ist, erstens eine experimentelle Kontrolle für das Funktionieren eines VIGS zu erstellen und zweitens zu zeigen, dass VIGS mittels TRV in *Cleome* funktioniert. Als experimentelle Kontrolle für das Funktionieren des VIGS wurde die Phytoendesaturase (PDS) gewählt. Eine Herunterregulierung dieses Gens führt zu einer Bleichung in Blättern und zum Teil auch in Teilen des Sprosses (Purkayastha und Dasgupta (2009)).

Die Sequenz der PDS für *Cleome* musste mittels bioinformatischer Methoden ermittelt werden. Nach Aufbearbeitung der Rohdaten der 454-Sequenzierung war, wie in Tabelle 3.6 auf Seite 55 zu sehen, die Qualitätsunterschiede zwischen den Sequenzierungsdaten der beiden Pflanzenproben vergleichbar. Auch die nachfolgende Zuordnung der Sequenzen des Transkriptoms zu bekannten AS-Sequenzen (Tabelle 3.7 auf Seite 56) zeigten keine wesentlichen Abweichungen nach Assemblierung in Trinity (Haas et al. (2013)). So wurden ca. 98 % (*C. gynandra*) bzw. 99 % (*C. spinosa*) der assemblierten Nukleotidsequenzen bekannten Sequenzen zugeordnet. Die nachfolgende Isolierung von PDS-Sequenzen aus beiden Datensätzen führte zu den in Tabelle 3.8 auf Seite 57 aufgeführten Sequenzen. In der Summe ist das Verhältnis von gefundenen PDS Sequenzen normiert auf ihre Länge und die Größe der Ausgangsdaten 1,4 zu 1 (*C. gynandra* zu *C. spinosa*). Diese Quantifizierung der Transkripte stellt keine Zuordnung der “reads” zum Genom der Pflanzen dar. Eine Quantifizierung an das bekannte Genom einer dritten Spezies (“cross-species reference mapping”, beschrieben in Bräutigam et al. (2011)) wurde nicht durchgeführt. Bei der durchgeführten, relativen Quantifizierung sollte nur das Vorkommen der Sequenzen

in den Datensätzen abgeschätzt werden. Da das relative Vorkommen der PDS-Sequenzen vergleichbar war, wurde von einer Verwendbarkeit der jeweiligen Sequenzen für die Folgeexperimente ausgegangen. Für das VIGS wurden Sequenzen gewählt, die für eine Herabregulierung aller, als PDS identifizierten Sequenzen führen sollten.

Die für das VIGS erforderlichen Sequenzen der PDS der *Cleome* lagen somit vor. Um ungewollte Nebenreaktionen bei einem RNAi der PDS auszuschließen, wurden die verwendeten Sequenzen in 21-mere aufgeteilt und gegen das Transkriptom abgeglichen. Da dabei nur Bindungspartner auftraten, die der PDS-Sequenz entsprachen, ist nicht von einer Beeinträchtigung anderer Transkripte bei der Durchführung eines VIGS auszugehen.

Nach Durchführung des VIGS mittels Inoculation von Agrobakterien war, wie in Abbildung 3.21 auf Seite 62 zu sehen, ein klarer Effekt in den als Kontrolle verwendeten *N. benthamiana* zu erkennen. Pflanzen, die mit pTRV1 und pTRV2\_NbPDS transfiziert wurden, zeigten eine klare Bleichung der Blätter und Teile der Sprossen. Kein Effekt trat wie erwartet bei den *N. benthamiana* auf, die nur mit pTRV1 transfiziert wurden.

Da auch bei *C. gynandra*, die mit pTRV1 und pTRV2\_CgPDS transfiziert wurden, kein Effekt zu beobachten war, sollte ein Nachweis des Transkriptes der DNA-Sequenz des "movement protein", der auf der T-DNA von pTRV1 liegt, durchgeführt werden. Bei einer erfolgreichen Infektion durch die Sequenzen des "Tobacco rattle virus" wären entsprechende Sequenzen in neu entstandenem Pflanzenmaterial nachweisbar. Da das "movement protein" Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion der Zielpflanze ist, würde das Fehlen der entsprechenden Sequenz für ein Ausbleiben der Infektion sprechen. Wie in Abbildung 3.23 auf Seite 64 zu sehen, ist ein Nachweis des "movement protein" von pTRV1 über cDNA nur in neu entstandenen Blättern von *N. benthamiana* möglich. Neu entstandene Blätter von *C. gynandra* weisen diese Sequenz hingegen nicht auf. Der Nachweis in den unteren Blättern von *C. gynandra* ist höchstwahrscheinlich auf die Transkription der entsprechenden Boten-RNS aus der inserierten T-DNA zurückzuführen. Da aber kein Nachweis in den mittleren und oberen Blättern für cDNA geführt werden konnte, wird davon ausgegangen, dass keine systemische Ausbreitung der Sequenz von pTRV1 (RNS1) und damit auch der Sequenz des "movement protein" in den entsprechenden Pflanzenproben vorhanden war. Damit wäre eine systemische Infektion durch die RNS1 des TRV unterblieben.

Es wurde bereits gezeigt, dass *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 bei *Cleome* erfolgreich verwendet werden kann (Brown et al. (2011)). Da weiterhin cDNA des "movement protein" aus den unteren Blättern (die mit Agrobakterien inokuliert wurden) nachgewiesen werden konnte, wird davon ausgegangen, dass der verwendete Stamm grundsätzlich geeignet ist, um *Cleome* zu infizieren.

Es ist der Schluss zu ziehen, dass die Verwendung von TRV in *Cleome* nicht möglich ist, da es zu keiner systemischen Ausbreitung innerhalb der Pflanzen gekommen ist. Die Überprüfung weiterer möglicher Viren für VIGS, die bei Arabidopsis verwendet werden können, wie den Potato virus X (PVX), den "Cabbage leaf curl virus" oder den "Turnip yellow mosaic virus" (Unver und Budak (2009)) sollte für zukünftige Experimente in

Betracht gezogen werden. Ebenso kommen auch Viren die andere C4-Pflanzen infizieren können, wie der “Brome mosaic virus” (BMV) oder der “Barley stripe mosaic virus” (Purkayastha und Dasgupta (2009)), in Frage.

## 4.8 Ausblick

Die Möglichkeit die C3- und C4-Photosynthese vergleichend zu analysieren, stellt eine große Chance dar. Die Verwendung von Versuchsobjekten derselben Gattung sollte Unterschiede zwischen den Pflanzen, wie zum Beispiel im Pflanzenmetabolismus, minimieren. Diese Vorteile der *Cleome* überwiegt etwaige Nachteile. So werden durch Veröffentlichungen neuer Techniken in der experimentellen Handhabung sowie verschiedenster physiologischer und genetischer Daten die Grundlage gelegt verschiedenste Aspekte der C4-Photosynthese aufzuklären. Dies könnte letztendlich zur Etablierung einer C4-Photosynthese in einer C3-Nutzpflanze wie zum Beispiel Reis (*Oryza sativa*) führen, mit der Hoffnung dadurch höhere Erträge zu erzielen (Leegood (2002); Matsuoka et al. (2001)).

Nachdem mit dieser Arbeit Grundlagen gelegt sind wie der Aufklärung der Funktion der Aquaporine im heterologen Expressionsmodell, die Bestätigung einer differentiellen Expression sowie der verschiedenen Photosynthesearten, wäre der nächste Schritt eine Gaswechselanalyse verschiedener CgPIP1;2 bzw. CsPIP1;2 “Knock-Down-” und Überexpressionsmutanten. Hierfür wäre eine stabile Transfizierung von *Cleome* mit entsprechenden induzierbaren oder konstitutiv exprimierten Konstrukten durchzuführen. Nachdem nun sowohl für *C. gynandra* (Brown et al. (2011)) als auch für *C. spinosa* (Uzilday et al. (2012)) Protokolle für eine stabile Transformation gegeben sind, wäre die Erstellung von entsprechenden Untersuchungsobjekten möglich. Parallel könnten Expressionsanalysen mit “Next Generation Sequencing” (NGS) Methoden durchgeführt werden, da mit Veröffentlichung der Genomischen Daten von *Cleome* weiterführende Analysen der verschiedenen Knock-Down und Überexpressionsmutanten (insbesondere quantitativ) möglich wären.

Weiterhin wäre die Entwicklung eines VIGS-Systems mit anderen Viren für *Cleome* angezeigt. Auf diese Weise könnte ein System geschaffen werden, mit dem man relativ schnell “Knock-Down”-Pflanzen generieren und - in Verbindung mit Gaswechselanalytik - analysieren könnte.

Ein Nachweis der Lokalisierung der Aquaporine auf zellulärer und auf Ebene des Gewebes wäre am besten über stabil transfizierte Pflanzen zu erbringen. Dann könnte über GFP-markierte Proteine und Kolo-kalisation mit Membran- und Organell-spezifischen Markern überprüft werden, ob es zu einer Lokalisation von CgPIP1;2 in den Mitochondrien und Chloroplastenmembranen der Bündelscheidenzellen kommt. Weiterhin wäre eine In-Situ-Immuno-Lokalisation möglich. Hierfür wäre die Isolation eines Antigens bzw. Synthese eines entsprechenden Peptides zur Erstellung eines entsprechenden Antikörpers

notwendig. In Verbindung zu den physiologischen Daten sowie der Betrachtung der auftretenden Transkriptmengen würde sich ein noch klareres Bild der Rolle von Aquaporinen in der C4-Photosynthese ergeben.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Methoden mit Desoxyribonukleinsäure (DNS)

#### 5.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

##### 5.1.1.1 Standard PCR

Mittels der PCR (eng.: Polymerase Chain Reaction) wurde der Nachweis über das Vorhandensein von DNA-Fragmenten erbracht. Weiterhin diente die PCR zur Amplifikation von Fragmenten zur weiteren Verwendung, z.B. in Klonierungsschritten. Die PCR wurde für gewöhnlich in einem Volumen von 25 µl durchgeführt.

Komponente	Masse/Stoffmenge/...
Template-DNA (Plasmid)	5-10 ng
DNA Puffer Biotherm (incl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) 10 x	1 x
dNTPs	(0,4 mM, 0,1 mM je Nukleotid)
Primer_s	10 pmol
Primer_as	10 pmol
Taq-Polymerase	1 U
dH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

**Tabelle (5.1) Zusammensetzung Standard PCR**

Ein Standard PCR Programm bestand aus:

1. Initiale Denaturierung 95 °C für 5 min
2. Denaturierung bei 95 °C für 45 sec
3. Annealing der Primer bei T<sub>m</sub> - 5 °C für 45 sec
4. Extension bei 72 °C für 1 min/ 1000 Nt
5. Wiederholung von 2. - 4.: 25 mal
6. Finale Extension 72 °C für 5 min
7. Stoppen der Reaktion 4 °C

#### 5.1.1.2 “Touch-down” PCR

Bei einer touch-down PCR wird im ersten Zyklus mit einer Annealingtemperatur, die über dem Schmelzpunkt der Primersequenzen ( $T_m$ ) liegt und die in jedem Subzyklus erniedrigt wird, gearbeitet. Dadurch sollen vermehrt die stringentest zum Primerpaar passenden DNA Fragmente amplifiziert werden. Dadurch liegen diese im zweiten Zyklus vermehrt vor und werden häufiger amplifiziert als weniger häufig vorkommende, konkurrierende Sequenzen, da diese nicht im ersten Zyklus amplifiziert wurden. Diese Bevorzugung der stringenteren Sequenzen durch ihr höheres Vorkommen findet nun bei jedem Amplifikationsschritt mit einer jeweils niedrigeren Annealingtemperatur als im vorangehenden Schritt statt (Methode nach Korbie und Mattick (2008)).

Das touch-down PCR Programm war wie folgt aufgebaut:

1. Initiale Denaturierung bei 95 °C für 3 min
2. Denaturierung bei 95 °C für 30 sec
3. Annealing der Primer bei  $T_m + 10$  °C für 45 sec
4. Extension bei 72 °C für 1 min/ 1000 Nukleotide Schritte 2-4 wurden 15 x wiederholt, wobei die Annealingtemperatur bei jedem Schritt, um 1 °C verringert wurde.
5. Denaturierung bei 95 °C für 30 sec
6. Annealing der Primer bei  $T_m - 5$  °C für 45 sec
7. Extension bei 72 °C für 1 min/ 1000 Nukleotide Schritte 5-7 wurden 25 x wiederholt
8. Finale Extension bei 72 °C für 5 min
9. Stoppen der Reaktion bei 4 °C

#### 5.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte üblicherweise in 0,8 % Agarosegelen. Als Puffer wurde 1 x TAE verwendet und eine Spannung von 5 - 10 Volt/ cm Gel angelegt. Die DNA wurde mittels Ethidiumbromid markiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Komponente	Konzentration
Tris	2 M
Essigsäure	1 M
Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern	

**Tabelle (5.2) Zusammensetzung 50 x TAE Puffer**

Komponente	Konzentration
Agarose	0,8 % (w/v)
1 x TAE	ad
Erhitzen bis zum Gelieren und auf ca. 60 °C abkühlen lassen	
Zugabe von Ethidiumbromid	0,05 µl/ ml
Lagerung bei 60 °C bis zum Gebrauch	

**Tabelle (5.3) Zusammensetzung 0,8 % Agarosegel**

### 5.1.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA erfolgte nach dem Protokoll des NucleoSpin®Extract II Kits von MACHERY-NAGEL. Hierzu wurden die zu isolierenden DNA - Banden mitsamt dem umgebenden Agarosegel aus dem Gesamtgel ausgeschnitten. Die Isolation wurde nach dem Ausschneiden auf einem UV-Tisch überprüft. Die DNA aus dem isolierten Gelstück wurde über eine Säule von der Agarose getrennt. Die finale Elution der DNA erfolgte in 30 µl dH<sub>2</sub>O.

### 5.1.4 Restriktionsabbau

Der Restriktionsabbau erfolgte üblicherweise in 30 µl Puffer. Der verwendete Puffer war abhängig vom verwendeten Enzym. Soweit parallel mehrere Enzyme verwendet wurden, wurde entsprechend des Vorschlags des Herstellers (NEB, Fermentas,...) das effektivste Puffersystem gewählt. Üblicherweise wurde 1 U Enzym auf 1 µg DNA gegeben.

### 5.1.5 Ligation von DNA Fragmenten in Vektoren

Die Ligation erfolgte üblicherweise mit 20 - 100 ng linearisiertem Vektor. Bei Klonierung eines DNA-Fragments wurde im molaren Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 5 (bezogen auf Vektor : DNA-Stück) linearisierter Vektor und DNA-Fragment zugegeben. Hierbei wurden passend restringierte DNA-Moleküle verwendet. Die Reaktion erfolgte im Puffer des Herstellers der T4-Ligase (Fermentas) mit den empfohlenen Enzymkonzentrationen bei 22 °C für mindestens 1 Stunde oder über Nacht bei 16 °C.

### 5.1.6 Klonierung mit dem Gateway-System von Invitrogen

Das Vorgehen erfolgte nach den Vorgaben des Gateway®-Cloning-Kits (Invitrogen). Entsprechend den Anweisungen von Invitrogen wurden Primer entwickelt, um PCR-Produkte zu erstellen, die in der BP-Reaktion verwendet werden können. Auf diese Weise wurden

- pDONR201\_CgPIP1;2,
- pDONR201\_CsPIP2;1,
- pDONR/Zeo\_CgPIP1;2 und



- pDONR/Zeo\_CsPIP1;2

erzeugt.

In der nachfolgenden LR-Reaktion wurden Hefeexpressionsvektoren

- pYesDest52\_CgPIP1;2,
- pYesDest52\_CsPIP1;2

sowie Plasmide mit Fluoreszenz-Fusionsproteinen

- pMDC83\_CgPIP1;2 und
- pMDC83\_CsPIP1;2

erzeugt.

### 5.1.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierungen wurden 600 - 700 ng Plasmid bzw. PCR-Produkt-Länge /4 = ng PCR-Produkt zu 20 pmol Primer in einem 0,2-ml-Reaktionsgefäß mit flachem Deckel gegeben und mit 7 µl dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Proben wurden nummeriert, und die Sequenzierungen erfolgten bei der Firma Seqlab.

## 5.2 Methoden mit Ribonukleinsäure (RNS)

### 5.2.1 Isolation von Gesamt-RNS aus Pflanzen (LiCl-Methode)

Es wurden 300 mg Gewebe in Stickstoff gemörsert. Die Probe wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 0,8 ml Lysipuffer gegeben und gut gevortext. Es wurden 0,8 ml PCI zugeben und 30 – 60 min bei RT geschüttelt. Danach wurde für 15 min bei 15k x g und RT abzentrifugiert und der Überstand abgenommen (600 - 800 µl). Dieser Schritt kann bei Bedarf (einer starken Färbung des Überstandes) wiederholt werden. Der Überstand wurde tröpfchenweise mit 0,75 Vol. 8 M LiCl versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 1 h. Danach wurde für 15 min bei 15k x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 700 µl 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen. Dieser Waschschrift konnte bei Bedarf wiederholt werden. Dann wurde für 5 min bei 15k x g, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 300 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst. Zu diesem Zeitpunkt war ein DNase Abbau möglich. Dann wurde mit 0,1 Vol. KOAc und 2,5 Vol. 100 % EtOH (-20 °C) für 30 min bei -80 °C bzw. ÜN bei -20 °C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 15k x g, 4 °C. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % EtOH (-20 °C) gewaschen und für 5 min bei 15k x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet. Hierfür wurde das Reaktionsgefäß 10 min offen auf Eis gestellt. Es wurde darauf geachtet, es nicht komplett eintrocknen zu lassen. Das Pellet wurde danach in 50 - 100 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst und über Photospektrometrie die Konzentration und Reinheit anhand einer 1:50 Verdünnung bestimmt.

Komponenten	Konzentrationen
NaCl	0,6 M
Tris/ HCl, pH 8,0	0,1 M
EDTA	0,01 M
SDS	4 %
DEPC	0,1 % (v/v)
1 h Inkubation bei RT, Autoklavieren	
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.4) Lysispuffer**

Komponenten	Konzentrationen
Phenol	25 Vol.
Chloroform	24 Vol.
Isoamylalkohol	1 Vol.
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.5) PCI-Lösung**

Komponenten	Konzentrationen
LiCl	8 M
DEPC	0,1 % (v/v)
1 h Inkubation bei RT, Autoklavieren	
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.6) LiCl-Lösung**

Komponenten	Konzentrationen
NaOAc pH 5 (Essigsäure)	3 M
DEPC	0,1 % (v/v)
1 h Inkubation bei RT, Autoklavieren	
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.7) NaOAc-Lösung**

Komponenten	Konzentrationen
96 % EtOH	70 % (v/v)
DEPC-ddH <sub>2</sub> O	ad
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.8) 70%-EtOH mit DEPC**

Komponenten	Konzentrationen
DEPC	0,1 % (v/v)
ddH <sub>2</sub> O	ad
1 h Inkubation bei RT, Autoklavieren	
Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.9) DEPC-ddH<sub>2</sub>O**

### 5.2.2 cDNS Synthese

Anhand von mRNS (eng.: messenger RNA, mRNA) wird mittels RNS-abhängiger DNS Polymerase und Oligo(dT) Primer cDNS (eng.: complementary DNA, cDNA) synthetisiert. Der Oligo(dT) Primer lagert sich an das Oligo(dA) 3'-Ende der mRNS an und dient als Anfangspunkt für die Synthese des zur mRNS komplementären DNS Gegenstranges.

Komponenten	Massen/ Volumina
Gesamt-RNS	0,5 - 2 µg
Oligo(dT) Primer (Stock: 20 µM)	4 µl
dNTP Mix (Stock: 10 mM je NTP)	4 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 16,5 µl
Inkubation für 5 min bei 70 °C	
auf Eis, abzentrifugieren	
10 x RT Puffer	2 µl
RNase Inhibitor (Stock 4 U/ µl)	0,5 µl
Mulv Reverse Transkriptase	1 µl
Inkubation 42 °C für 1 h	
Inkubation 90 °C für 10 min	
Lagerung bei -20 °C	

**Tabelle (5.10) cDNS Synthese**

### 5.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNS

Zur Analyse und für Folgeexperimente wurde RNS in einem denaturierenden Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden 10 µg der Gesamt-RNS mit einem Volumen des 2 x RNS-Gel-Ladepuffers versetzt und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Nach einer Inkubation von 2 min auf Eis wurden die RNS-Proben aufgrund ihrer Größe in einem 1 % denaturierenden 1 x MEN-Agarose-Formaldehyd-Gel bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss konnte das typische rRNS-Bandenmuster unter UV-Licht ( $\lambda$  366 nm) aufgrund der Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Klare voneinander zu unterscheidende Banden sprechen für die Qualität der RNS-Präparation.

Komponente	Konzentration
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	200 mM
EDTA, pH 8,0	10 mM
Natriumacetat	50 mM
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.11) Zusammensetzung 10 x MEN-Puffer**

Komponente	Volumina
Formamid	0,72 ml
10 x MEN	0,16 ml
37 % Formaldehyd	0,26 ml
dH <sub>2</sub> O	0,18 ml
80 % Glycerin	0,10 ml
2 % Bromphenol	0,08 ml
1 % Ethidiumbromid	3 µl
Lagerung bei -20 °C	

**Tabelle (5.12) Zusammensetzung RNS-Gel-Ladepuffer**

Komponente	Massen/ Volumina
Agarose	0,35 g
10 x MEN	3,5 ml
dH <sub>2</sub> O	30 ml
in der Mikrowelle aufkochen und auf 50 °C abkühlen	
37 % Formaldehyd	2,7 ml

**Tabelle (5.13) Zusammensetzung MEN-Agarose-Gel (35ml)**

#### 5.2.4 Northern Blot

Zum Nachweis spezifischer Sequenzen wird RNS elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen ("geblottet") und dort kovalent gebunden. Der Nachweis der spezifischen Sequenzen erfolgt über die Bindung Basenpaar komplementärer Sonden aus markierter DNA. Diese kann durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Es wurde jeweils photometrisch die RNS-Konzentration bestimmt und 1 µg RNS für die elektrophoretischen Auftrennung in einem denaturierenden Agarosegel eingesetzt. Die RNS wurde geblottet und mittels Digoxigenin-markierter CgPIP1;2 und CsPIP1;2 DNS (dt.: Desoxyribonukleinsäure, eng.: deoxyribonucleic acid) markiert. Bei dem Northern Blot wurde darauf geachtet, jeweils die gleiche Stoffmenge an Sonde einzusetzen. Eine Kreuzreaktion der Sonden wurde in einem Vorversuch ausgeschlossen. Das Digoxigenin (DIG) wurde

danach mit einem, an eine mit alkalischer Phosphatase konjugierten, DIG-Antikörper markiert und die Chemilumineszenz detektiert. Die Transkriptmenge der beiden Aquaporine wurden mit dem Programm ImageJ ermittelt. Dafür wurden die Grauwerte der Banden des Blots (8 Bit Bild) quantifiziert und auf den Wert von CgPIP1;2 normiert.

#### 5.2.4.1 Herstellung von Sonden

Die Sonden wurden mittels PCR hergestellt, hierbei wurde DIG-11-UTP in die entstehenden Moleküle eingebaut. Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermocycler nach Standard-Protokoll vervielfältigt. Als Kontrolle wurde eine identische Reaktion ohne DIG-11-UTP angesetzt und beide in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt. War der Einbau von DIG-11-UTP in die Sonde erfolgreich, so war die Bande der Sonde etwas oberhalb der Kontroll-Bande.

Komponente	Volumina
NEB PCR-Puffer (10 x)	2,5 µl
dNTP-Mix (10mM, 2,5 mM je Nukleotid)	1 µl
DIG-11-UTP (0,1 mM)	2,5 µl
Primer_s	1 µl
Primer_as	1 µl
Plasmid DNA	5 ng
NEB Taq-Polymerase	1 µl
dH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

**Tabelle (5.14) Zusammensetzung PCR-Ansatz zur Markierung von cDNS-Sonden (25 µl)**

#### 5.2.4.2 Transfer der RNS auf eine Nylon-Membran

Das hier verwendete Verfahren zum Transfer von RNS aus einem MEN-Agarose-Gel auf eine Membran wird als "Northern Blot" bezeichnet. Über Kapillarkräfte wurde die RNS aus dem Gel auf eine darunterliegende Nylon-Membran (Pure Nylon Neutral Transfer Membrane 0,45 µm, AppliChem) transferiert. Dazu wurde nach der Gelelektrophorese das RNS-Gel luftblasenfrei auf einer mit Transferpuffer (10 x SSC) getränkten Membran von der Größe des Gels platziert. Der Aufbau war wie folgt (von unten nach oben):

1. Stapel saugfähigen Papiers (Höhe ca. 15 cm)
2. zwei Whatman-Papiere (getränkt in 10 x SSC)
3. Eine Plastikfolie mit einem viereckigen Ausschnitt (in der Größe der folgenden Nylonmembran)
4. die Nylonmembran (getränkt in 10 x SSC)
5. das RNS-Gel

6. 2 Whatman-Papiere (getränkt in 10 x SSC)
7. Streifen Whatman-Papier (getränkt in 10 x SSC), dessen Enden sich in Reservoirbehältern mit 10 x SSC befinden
8. ein Gelschlitten
9. ein Gewicht (ca. 250 g)

Der Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur vertikal von oben nach unten. Die RNS wurde anschließend auf der Membran durch 150 mJoules cm<sup>-2</sup> UV-Licht (Bio-Link BLX 245, LTF Labortechnik) fixiert.

Komponente	Konzentration
NaCl	3 M
Natriumcitrat, pH 7,0 (HCl)	0,3 M
dH <sub>2</sub> O	ad

**Tabelle (5.15) Zusammensetzung 20 x SSC**

### 5.2.4.3 Hybridisierung und Detektion

#### Prehybridization der Membran

Die Membran wurde in ein Falconröhrchen gegeben und 10 ml DIG EasyHyb (Roche) Lösung (aufgewärmt auf 42 °C) hinzugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für 1 h.

#### Hybridisierung mit der DIG-11-dUTP Sonde

50 ng/ ml Hybridisierungsvolumen der DIG-11-dUTP Sonde wurden zu 100 µl DIG EasyHyb gegeben und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde die Sonde für 2 min auf Eis inkubiert. Die Sonde wurde zur Membran hinzugegeben und bei 42 °C über Nacht inkubiert.

#### Waschen der Membran

Die Membran wurde für 10 min in 2 x SSC bei RT unter schütteln inkubiert, danach 30 min in 2 x SSC, 1 % SDS, 60 °C unter Schütteln inkubiert, danach 15 min in 2 x SSC, 1% SDS, RT unter inkubiert.

#### Blocken der Membran

Die Membran wurde für 30 min unter Schütteln in "Blocking Solution" gegeben.

#### Inkubation in der DIG-Antikörper-Lösung.

Die Membran wurde für 1 h bei RT unter Schütteln in 10 ml der "AB Solution" inkubiert und danach für 3 x 10 min in PBS/ 0,5% Tween 20 bei RT unter Schütteln gewaschen. Die Membran wurde für 2 x 10 min in Assay B bei RT unter Schütteln equilibriert. Danach wurde die Membran auf einer flachen Oberfläche mit 1 ml der Nitroblocklösung bei RT für 5 min inkubiert. Danach wurde sie in Assay B für 5 min unter Schütteln gewaschen. Die Membran wurde auf eine flache Plastikfolie gelegt und mit 1 ml CDP Star Lösung bei RT für 5 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran in die Folie

eingewickelt. Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte an der Chemidoc Universal Hood II (Biorad-Segrate) ohne Filter mit der Programmeinstellung "Chemi Ultra" bei maximal geöffneter Iris. Für eine verlässliche Aussage ist darauf zu achten, die gleiche Masse an Boten-RNS einer elektrophoretischen Auftrennung zuzuführen und die gleiche Stoffmenge an Sonde für den Blot zu verwenden. Eine Kreuzreaktion der Sonden wurde in einem Vorversuch ausgeschlossen, ebenso das Funktionieren der Sonden überprüft. Die Sonden zeigten hierbei eine vergleichbare Affinität für das jeweils passende PCR-Produkt, das in jeweils gleicher Konzentration auf eine Membran geblottet wurde.

Bei der Auswertung des Blots wird gefolgert, dass die Signalstärke der Expression entspricht. Die Berechnung des Signals erfolgt dabei unter Herausrechnung des Hintergrundsignals.

Komponente	Konzentration
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	82,3 g/ 1000 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	23,5 g/ 1000 ml
NaCl	40 g/ 1000 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1000ml

**Tabelle (5.16) Zusammensetzung 10 x PBS**

Komponente	Konzentrationen
PBS	1 x
Tween 20	0,5 % (v/v)

**Tabelle (5.17) Zusammensetzung 1 x PBS/ 0,5% Tween 20**

Komponente	Konzentrationen
Tris/ HCl, pH 9,8	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
dH <sub>2</sub> O	ad

**Tabelle (5.18) Zusammensetzung 10 x AssayB**

Komponente	Konzentrationen
NaCl	3 M
Natriumcitrat, pH 7 (HCl)	0,3 M
dH <sub>2</sub> O	ad

**Tabelle (5.19) Zusammensetzung 20 x SSC**

Komponente	Konzentrationen
Trockenmilchpulver	5 % (w/v)
1 x PBS/ 0,5% Tween 20	ad

**Tabelle (5.20) Zusammensetzung Blocking Solution**

Komponente	Volumina/ Konzentrationen
Blocking Solution	1 Vol.
1 x PBS/ 0,5% Tween 20	1 Vol.
Anti-Digoxigenin-AB Fab fragments (Roche)	AB 1:10000 (1µl/ 10 ml)

**Tabelle (5.21) Zusammensetzung Antikörperlösung**

Komponente	Volumina
Tropix Nitroblock II (Applied Biosystems)	1 Vol.
Assay B	19 Vol.

**Tabelle (5.22) Zusammensetzung Nitroblocklösung**

Komponente	Volumina
Tropix CDP Star (Applied Biosystems)	1 Vol.
Assay B	49 Vol.

**Tabelle (5.23) Zusammensetzung CDP Star Lösung**

## 5.3 Methoden mit *E. coli*

### 5.3.1 Verwendete Stämme

- DH5α;  
Genotyp: F<sup>-</sup> deoR recAI endAI hsdR1(r<sub>k</sub> - m<sub>k</sub> +) supE44 1-thi gyrA96 relAI
- DB3.1;  
Genotyp: F<sup>-</sup> gyrA462 endA1 (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl-5 Δleu mtl1

### 5.3.2 Anzucht

Die *E. coli* wurden in Flüssigkultur angezogen, indem entweder aus einer Glycerolkultur oder von Platte mittels eines sterilen Zahnstochers eine Animpfung einer Flüssigkultur stattfand. Diese Proben wurden über Nacht bei 37 °C, 150 rpm inkubiert. Die so



gewonnenen Übernachtskulturen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Eine Anzucht auf Platte erfolgte, indem mit einer Impföse eine Probe ausgestrichen und ausgedünnt wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und danach für maximal 2 Wochen im Kühlschrank gelagert.

Komponente	Konzentrationen
Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
ad dH <sub>2</sub> O	ad
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.24) Zusammensetzung LB-Medium flüssig**

Komponente	Konzentrationen
Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	
Autoklavieren und auf 55 °C abkühlen lassen	
Zugabe Antibiotika	
Platten gießen und diese bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.25) Zusammensetzung LB-Platten**

### 5.3.3 Chemische Transformation

Die Methode zur Erstellung chemisch kompetenter *E. coli* erfolgte nach Inoue et al. (1990).

#### 5.3.3.1 Präparation kompetenter Zellen

250 ml SOB wurden mit 0,75 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in einem 2 Liter Kolben angeimpft und bei 18 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 über Nacht kultiviert. Die Zellsuspension wurde hiernach für 10 min in einem Eisbad inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Es wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) unter sanftem Schwenken zugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 0,5 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

### 5.3.3.2 Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und je 100 µl Zellsuspension mit 0,5 - 5 µl gelöster DNS für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec durchgeführt und die Zellen danach für 2 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml SOC-Medium und Inkubation bei 37 °C, 200 rpm für 1 h. Anschließend wurde jeweils 300 µl Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Komponente	Konzentrationen
Hepes	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
auf pH 6,7 einstellen mit KOH	
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Sterilfiltration der Lösung und Lagerung bei 4 °C	

**Tabelle (5.26) Zusammensetzung TB-Puffer**

Komponente	Konzentrationen
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Trypton	2 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Auf pH 6,3 einstellen, autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.27) Zusammensetzung SOB-Medium**

Komponente	Konzentrationen
Bacto-Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
KCl	2,5 mM
Glukose	20 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
pH auf 7,0 einstellen	
Autoklavieren und 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern	

**Tabelle (5.28) Zusammensetzung SOC-Medium**

### 5.3.4 Plasmidisolation

Von einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 1,5 ml entnommen und die Bakterien bei ca. 15k x g für 30 sec abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300 µl Puffer P1 durch Vortexen resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 300 µl P2 und nach einmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes lysiert. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Fällung von Proteinen und konjugierter genomischer DNS erfolgte durch Zugabe von 300 µl P3, vorsichtigem Invertieren und 15-minütiger Inkubation auf Eis. Eine Abtrennung von genomischer DNS und Proteinen erfolgte durch eine 15-minütige Zentrifugation bei ca. 15k x g. Es wurden 500 µl des Überstandes in 700 µl Isopropanol überführt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Die DNS wurde durch Zentrifugation bei ca. 15k x g für 15 min sedimentiert, der Überstand verworfen. Salze wurden durch Zugabe von 500 µl 70 % EtOH und für 10 min bei ca. 15k x g entfernt, der Überstand komplett verworfen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet bis das EtOH vollständig beseitigt worden war. Danach wurden ca. 30 µl dH<sub>2</sub>O hinzugegeben, um die DNS zu resuspendieren.

Komponente	Konzentrationen
Tris/ HCl (pH 8)	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A 100 µg/ ml (Zugabe nach dem autoklavieren, vor Benutzung)	
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.29) Zusammensetzung P1 Resuspensionspuffer**

Komponente	Konzentrationen
NaOH	200 mM
SDS	1 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.30) Zusammensetzung P2 Lysispuffer**

Komponente	Konzentrationen
Kaliumacetat pH 5,5	3 M
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.31) Zusammensetzung P3 Neutralisationspuffer**

### 5.3.5 Kolonie-PCR

Zum Nachweis eines bestimmten Inserts in den Plasmiden einer Bakterienkolonie wurde diese mittels eines Zahnstochers gepickt und als Template in einen PCR-Ansatz überführt. Die PCR erfolgte ansonsten nach Standardbedingungen.

### 5.3.6 TA-Klonierung und Blau-Weiß-Selektion

Um DNS-Fragmente, die durch eine PCR hergestellt wurden, für weitere Experimente zur Verfügung zu haben, wurden diese mittels TA-Klonierung in den Vektor pDrive kloniert. Dabei binden Desoxyadenosinüberhänge der PCR-Produkte an Desoxythymidinüberhänge des linearisierten pDrive-Vektors und das Fragment wird ungerichtet in den Vektor ligiert. Bakterien mit Insert verlieren ihre  $\beta$ -Galactosidase Aktivität und können durch Kultivierung auf X-gal und IPTG -haltigem Medium identifiziert werden. Die Durchführung der TA-Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers (QIAGEN®PCR Cloning Handbook (April 2001)). Hiernach erfolgte eine Transformation von chemisch kompetenten DH5 $\alpha$  und Selektion auf Agarplatten für Blau/Weiß Selektion.

Komponente	Konzentrationen
Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
Mit NaOH den pH auf 7.0 einstellen	
Agar	1,5 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und auf 55 °C abkühlen lassen	
Ampicillin	100 mg/l
Kanamycin	30 mg/l
X-gal	80 mg/l
IPTG	50 $\mu$ M
Platten gießen und diese bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.32) Zusammensetzung LB (Luria Bertani) Agar Platten für Blau/Weiß Selektion**

### 5.3.7 Dauerkulturen

500  $\mu$ l einer Bakterienübernachtskultur wurden in 500  $\mu$ l 50 % Glycerol (v/v) überführt und gevortext. Die Proben wurden danach sofort bei -80 °C weggefroren.

## 5.4 Methoden mit *A. tumefaciens*

### 5.4.1 Verwendete Stämme

- LBA4404;  
Chromosomaler Marker: Rifampicin; Ti Plasmid Marker: Streptomycin

### 5.4.2 Anzucht von *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* wurden in Flüssigkultur angezogen, indem aus einer Glycerolkultur oder von Platte mittels eines sterilen Zahnstochers eine Animpfung stattfand. Diese Proben wurden über Nacht bei 28 °C, 200 rpm inkubiert und am nächsten Tag direkt verwendet. Bei Flüssigkulturen wurden jeweils die Anzuchtgefäße so gewählt, dass ein Verhältnis Gas : Flüssigkeit von 4 : 1 erreicht wurde. Wenn nötig, wurden die so gewonnenen Übernachtskulturen bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Eine Kultivierung auf Platte erfolgte, indem mit einer Impföse eine Probe ausgestrichen und ausgedünnt wurde. Die Platten wurden für 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert und danach für maximal 2 Wochen im Kühlschrank gelagert.

### 5.4.3 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Es wurde 1 ml einer Übernachtskultur verwendet, um 50 ml LB zu inokulieren. Die Zellen wurden 3 - 5 h bei 28 °C, 200 rpm kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,8 erreicht wurde. Die Kulturflasche wurde danach für 15 min auf Eis gelagert und danach jeweils bei ca. 4 °C weiterverarbeitet. Die Zellen wurden bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml vorgekühltem 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und erneut bei 3000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde hiernach in 1 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Zellen wurden bei - 80 °C gelagert.

### 5.4.4 Hitzeschocktransformation

Aliquots der gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Zellen wurden 50 - 1000 ng DNS gegeben, vorsichtig gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 37 °C für 5 min. Danach wurde 1 ml LB zugegeben und die Suspension für 2 - 4 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Jeweils 300 µl des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika (für Chromosomaler Marker, Ti Plasmid und transformierten Vektor) ausgestrichen und bei 28 °C für 2 - 3 Tage inkubiert. Kolonien wurden vereinzelt und für weitere für 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Überprüfung der Transformation mittels Kolonie-PCR. Positive Klone wurden bei 4 °C für maximal 2 Wochen gelagert und Dauerkulturen angelegt entsprechend dem Vorgehen bei *E. coli*.

## 5.5 Methoden mit *S. cerevisiae*

### 5.5.1 Verwendete Stämme

- W303  
Genotyp: MATa/ MAT $\alpha$ , leu2-3,112, trp1-1, can1-100, ura3-1, ade2-1, his3-11,15, GAL;  
Herkunft: Euroscarf

### 5.5.2 Anzucht von Hefen und Induktion der Genexpression

Hefen aus Dauerkulturen wurden auf einem entsprechendem Medium ausgestrichen und vereinzelt. Nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 30 °C wurden die Platten für maximal weitere 14 Tage im Kühlschrank gelagert. Hefekolonien von Platte wurden verwendet, um Flüssigmedium anzupfen. Dieses wurde bei 30 °C, 125 rpm inkubiert bis zur Verwendung der Zellsuspension. YEPD Medium wurde zur Anzucht von Wildtyp Hefen verwendet, SC-Medium mit entsprechender Aminosäurezusammensetzung zur Anzucht von transformierten Hefen. Zur Induktion der Genexpression wurden Hefen von SC-Medium mit Glukose in SC-Medium mit Galaktose überführt. Hierzu wurden die Hefen abzentrifugiert, und auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,6 mittels galaktosehaltigem Medium eingestellt. Die Transkription wurde, bei Verwendung entsprechender Plasmide, durch den GAL1 Promoter in der Anwesenheit von Glukose reprimiert.

Komponente	Konzentrationen
Hefeextrakt	1 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit KOH auf pH 6,0 einstellen	
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.33) Zusammensetzung YEPD Flüssigmedium**

Komponente	Konzentrationen
Hefe Extrakt	1 % (w/v)
Pepton	2 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit KOH auf pH 6,0 einstellen	
Agar	1,5 % (w/v)
Autoklavieren und Platten gießen. Diese bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.34) Zusammensetzung YEPD Platten**

Komponente	Konzentrationen
Glukose	2 % (w/v)
Ammoniumsulfat	0,25 % (w/v)
YNB w.o. AA	0,17 % (w/v)
Aminosäurestock	0,12 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit KOH auf pH 6,0 einstellen	
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.35) Zusammensetzung SC-Medium flüssig (Anzucht)**

Komponente	Konzentrationen
Galaktose	2 % (w/v)
Ammoniumsulfat	0,25 % (w/v)
YNB w.o. AA	0,17 % (w/v)
Aminosäurestock	0,12 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit KOH auf pH 6,0 einstellen	
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.36) Zusammensetzung SC-Medium flüssig (Induktion der Genexpression)**

Komponente	Konzentrationen
Glukose	2 % (w/v)
Ammoniumsulfat	0,25 % (w/v)
YNB w.o. AA	0,17 % (w/v)
Aminosäurestock	0,12 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Agar	1,5 % (w/v)
Mit KOH auf pH 6,0 einstellen	
Autoklavieren und Platten gießen, diese bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.37) Zusammensetzung SC-Medium Platten**

Komponente	Masse
Adeninsulfat, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil	Je 1 g
Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin	Je 0,5 g
Alle Aminosäuren außer dem Selektionsmarker wurden gemischt und bei RT gelagert.	

**Tabelle (5.38) Zusammensetzung Aminosäurestock**

### 5.5.3 Transfektion von *S. cerevisiae*

Die Methode erfolgte nach dem CLONTECH-Yeastmaker Protocol (PT3049-1).

#### 5.5.3.1 Herstellung kompetenter Hefen

50 ml YEPD wurden mit 1,5 µl einer Übernachtskultur von Hefe (Stamm W303) angeimpft und ca. 16 h bei 30 °C, 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 50 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 16 ml steriler LiAc/ TE-Lsg. resuspendiert und bei 50 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml steriler LiAc/ TE-Lsg. resuspendiert und für 1 h bei 30 °C, 75 rpm inkubiert. Die Zellen waren danach bereit für die Transfektion oder konnten abzentrifugiert (50 g, 5 min) und das Pellet in 0,1 M LiAc/ TE/ 15 % Glycerol resuspendiert und bei -80 °C weggefroren und gelagert werden.

Komponente	Konzentrationen
LiAc	0,1 M
Tris/ HCl (pH 7,5)	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.39) Zusammensetzung LiAc/ TE-Lsg.**

Komponente	Konzentrationen
LiAc	0,1 M
Tris/ HCl (pH 7,5)	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
Glycerol	15 % (v/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.40) Zusammensetzung LiAc/ TE/ 15 % Glycerol**



### 5.5.3.2 Transfektion der Hefezellen

Die kompetenten Hefen wurden gegebenenfalls auf Eis aufgetaut. Die Lachssperma-DNS wurde 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Es wurden 500 µg der Lachssperma DNS (12 µg/ µl) sowie 1 µg Plasmid DNS zu 100 µl kompetenter Hefezellen gegeben und gemischt. Danach wurden 0,6 ml sterile PEG/ LiAc/ TE-Lsg. zugegeben, gevortext und bei 30 °C, 200 rpm für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden danach 15 min bei 42 °C und hiernach 3 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 50 x g für 1 min abzentrifugiert und das Pellet in 0,3 ml 1 x TE-Puffer resuspendiert. Es wurde 300 µl jedes Ansatzes auf eine SC-Medium Platte mit entsprechender Aminosäureselektion ausplattiert und für 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Von den Transformanten wurden auf SC-Medium Platten mit entsprechender Aminosäureselektion ein Reinigungsausstrich vorgenommen.

Komponente	Konzentrationen
LiAc	0,1 M
Tris/ HCl (pH 7,5)	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
PEG	50 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei 4 °C lagern	

**Tabelle (5.41) Zusammensetzung PEG/ LiAc/ TE-Lsg.**

### 5.5.4 Kolonie-PCR

Zum Nachweis einer Sequenz in den Plasmiden einer Hefekultur wurde diese mittels eines Zahnstochers gepickt und in 3 µl 0,02 M NaOH überführt. Die Proben wurden hiernach bei 99 °C für 10 min inkubiert. Hiervon wurden eine 5 µl einer 1:20 Verdünnung als Template in einen PCR Ansatz überführt. Die PCR erfolgte ansonsten nach Standardbedingungen.

### 5.5.5 Dauerkulturen

500 µl einer Übernachtskultur wurden in 500 µl 50 % (v/v) Glycerol überführt und gevortext. Die Proben wurden danach sofort bei -80 °C weggefroren.

### 5.5.6 Stopped-Flow Spektrometrie

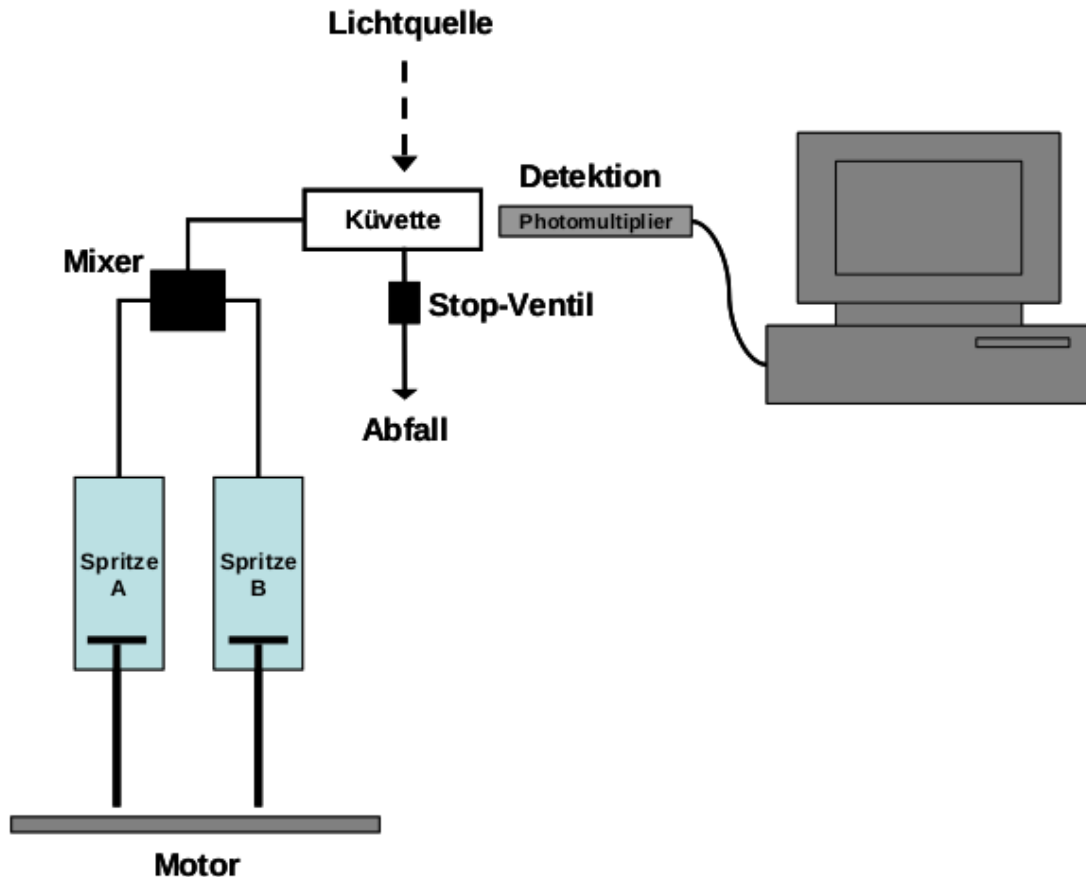
Bei Stopped-Flow Spektrometrie werden Lösungen miteinander schnell gemischt und Reaktionen spektroskopisch beobachtet. Vorliegend wurde mit der Mischeinheit SFM 300 (BioLogic) sowie der Detektionseinheit MOS256 (BioLogic) gearbeitet. Die schematische Darstellung ist in Abbildung 5.1 auf Seite 101 dargestellt. Die Mischeinheit besteht aus zwei motorbetriebenen, computergesteuerten Spritzen mit einem Volumen von 10 ml. Die Lösungen werden in den Mixer gedrückt und weiter in die Küvette FC-08 (BioLogic).

Das Stop-Ventil am Ausgang der Küvette registriert das Lösungsgemisch. Dann erfolgt ein Schliessen der Küvette, und die motorbetriebenen Spritzen werden gestoppt. In der Küvette kann nun die Reaktion stattfinden. Von einer Xenon/ Quecksilber-Lampe wird Licht definierter Wellenlänge in die Küvette geleitet. Eine Änderung in der Intensität des Streulichts (Spektrophotometrie) bzw. eine Änderung in der durch das Messlicht erzeugten Fluoreszenz (Spektrofluorometrie) wird über den Photomultiplier detektiert und im angeschlossenen Computer aufgezeichnet.

Bei der Spektrophotometrie - zur Bestimmung der Wasserleitfähigkeit - wird das Anschwellen von Hefeprotoplasten durch ein Überführen in ein hypoosmolares Medium untersucht. Das Messlicht (definierter Wellenlänge) streut an der Oberfläche der Protoplasten, wobei die Vergrößerung der Oberfläche zu einer Veränderung der Streulichtintensität im 90° Winkel führt. Diese Veränderung der Streulichtintensität wird am Photomultiplier detektiert und am Computer aufgezeichnet. Die Expression verschiedener Aquaporine in den Hefen ist möglich, da native Aquaporine der Hefe beim verwendeten Stamm W303 entweder durch Mutation inaktiviert wurde (AQY2, FPS1), oder nur im Stadium als Spore exprimiert werden (AQP1).

Bei der Spektrofluorometrie - zur Bestimmung der Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> - wird monochromatisches Licht ( $\lambda$  490 nm) zur Anregung der Fluoreszenz von Fluoreszein verwendet. Diese Fluoreszenzänderung wurde im 90° Winkel detektiert, wobei mittels eines ( $\lambda$  505 nm) Hochpassfilters Hintergrundstrahlung reduziert wurde. Eine Aufzeichnung des am Photomultiplier detektierten Signals erfolgte mittels Computer.

Die Messapparatur wurde durch ein angeschlossenes Kühlaggregat auf 10 °C gehalten. Für die Spektrofluorometrie wurde als Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeindiacetat (FDA) verwendet. Die "Beladung" der Zellen mit FDA konnte durch ihre Gelbfärbung beobachtet werden. Hierbei wird durch Esteraseaktivität das Acetat des FDA in den Zellen abgespalten.



**Abbildung (5.1) Stopped-Flow Spektrometrie**

Schematische Darstellung des Aufbaus der Stopped-Flow Spektrometrie. Definierte Volumina aus Spritze A und B werden nach dem Mischen im Mixer in die Küvette geleitet. Veränderungen in der Fluoreszenzintensität bzw. in der Intensität des Streulichts werden detektiert und in einem Computer aufgezeichnet. Darstellung aus Fischer (2007).

#### 5.5.6.1 Stopped-Flow Spektrophotometrie

Von Platte wurde eine Hefekolonie in 40 ml SC Selektionsmedium mit Glukose überführt und bei 30 °C über Nacht angezogen. Die  $OD_{600}$  wurde bestimmt und die Zellen bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit 40 ml galaktosehaltigem SC Induktionsmedium (sowie parallel als Kontrolle mit glukosehaltigem SC Medium) auf eine  $OD_{600} = 0,4$  eingestellt und über Nacht bis auf eine  $OD_{600} = 1,0$  angezogen. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 3 ml destilliertem Wasser resuspendiert und die Zellen bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Puffer 1 resuspendiert und für 15 min bei 30 °C, 150 rpm inkubiert. Zum Ansatz wurden dann jeweils 6 ml Puffer 2, ca. 2 mg Zymolyase 20-T und ca. 100 mg BSA gegeben und für 45 - 60 min bei 30 °C, 150 rpm protoplastiert. Die Protoplasten wurden bei 1500 x g

für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 5 ml Puffer 3 resuspendiert und bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer 3 resuspendiert und der Ansatz bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Komponente	Konzentrationen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2 mit KOH)	50 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und Lagerung bei RT	
β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
Vor Verwendung zugeben	

**Tabelle (5.42) Zusammensetzung Puffer 1**

Komponente	Konzentrationen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2 mit KOH)	50 mM
Sorbitol	2,4 M
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und Lagerung bei RT	
β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
Vor Gebrauch zugeben	

**Tabelle (5.43) Zusammensetzung Puffer 2**

Komponente	Konzentrationen
Sorbitol	1,8 M
NaCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Tris/ HCl pH 7,0	10 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklaviert und Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.44) Zusammensetzung Puffer 3 – Hefeaufnahmepuffer**

Komponente	Konzentrationen
Sorbitol	1,2 M
NaCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Tris/ HCl pH 7,0	10 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklaviert und Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.45) Zusammensetzung Puffer 4 – Mischpuffer**

#### 5.5.6.2 Osmotischer Permeabilitätskoeffizient ( $P_f$ ) der Plasmamembran der *S. cerevisiae* Protoplasten

Die mit der Stopped-Flow gemessenen Kurven wurden mit Algorithmus 6 mittels des Programmes "R" gefittet. Die ermittelte Reaktionskonstante ( $k$ ) wurde benutzt, um mittels des Algorithmus 7 die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ = osmotic water permeability [ $\text{ms}^{-1}$ ]) zu ermitteln. Hierbei wurden folgende Werte verwendet: Durchmesser W303 Protoplasten  $d = 3,42 \pm 0,05 \mu\text{m}$  aus Heckwolf (2010), daraus resultiert Volumen Protoplasten  $V_0 = 2,0944 \cdot 10^{-17} \text{ m}^3$ , Oberfläche Protoplasten  $S_0 = 3,6745 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2$ . Für das molare Volumen von Wasser wurde  $V_W = 18,07 \cdot 10^{-3} \text{ l mol}^{-1}$ , für den Konzentrationsunterschied zwischen Außen und Innen wurde  $c_{O-I} = 0,6 \text{ mol l}^{-1}$  zu Grunde gelegt.

$$f(t) = c * e^{-k*t}$$

##### Algorithmus (6) Exponentieller Fit zur Ermittlung Reaktionskonstante in Stopped-Flow-Messungen

Mittels der Formel für exponentiellen Zerfall wurde eine Kurvenanpassung an den Kinetiken durchgeführt. Die Amplitude ( $c$ ) war durch die Normierung konstant, während die Reaktionskonstante ( $k$ ) über den zeitlichen Verlauf ( $t$ ) durch Interpolation mit der Methode der kleinsten Quadrate mittels des Programms R berechnet wurde.

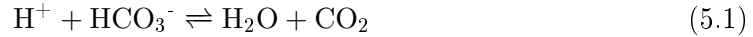
$$P_f = k * \frac{V_0}{S_0 * V_W * c_{O-I}}$$

##### Algorithmus (7) Formel für die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ )

Die Bestimmung der osmotischen Wasserpermeabilität (eng.: osmotic water permeability ( $P_f$ ) [ $\text{ms}^{-1}$ ]) erfolgte nach der Formel von van Heeswijk und van Os (1986). Hierbei wurden das molare Volumen von Wasser ( $V_W$ ), das Volumen der Protoplasten ( $V_0$ ), deren Oberfläche ( $S_0$ ) sowie die Differenz der Konzentration der osmotisch wirksamen Teilchen zwischen Innen- und Außenmedium ( $c_{O-I}$ ) zur Berechnung verwendet.

### 5.5.6.3 Stopped-Flow Spektrofluorometrie

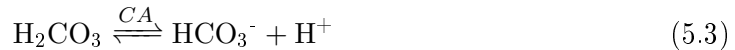
**Cytosolische Änderung des pHs von *S. cerevisiae* Zellen** Verwendet wurde der Farbstoff Fluoreszeindiacetat. Dieser wird innerhalb der Hefezellen durch intrazellulären Esterasen hydrolysiert und erzeugt so Fluoreszein. Die Hefezellen werden mit dem Farbstoff inkubiert, so dass sie ihn aufnehmen und dann mit einem CO<sub>2</sub>-haltigem Puffer gemischt. Dabei sind die nachfolgenden Reaktionen von Bedeutung.



Dargestellt in Reaktionsgleichung 5.1 ist die Gleichgewichtsreaktion von Umsatz Hydrogencarbonat und Protonen zu CO<sub>2</sub> und Wasser im Mischpuffer. Das CO<sub>2</sub> liegt gasförmig oder in Form von Kohlensäure im Puffer vor und kann dann in die Zelle diffundieren.



Dargestellt in Reaktionsgleichung 5.2 ist der schnelle Umsatz des Anhydrids CO<sub>2</sub> zu Dihydrogencarbonat (Kohlensäure) innerhalb der Hefezellen mittels Carboanhydrase.



Die Kohlensäure gibt (Reaktionsgleichung 5.3) als zweiprotonige Säure H<sup>+</sup> in zwei Dissoziationsstufen ab. Die dadurch folgende Ansäuerung des Zytosols führt zu einer Veränderung der Quantenausbeute des Fluoreszeins (Slavik (1983) und Slavik (1982)). Diese Änderung wird zeitlich aufgelöst detektiert. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist hierbei indirekt ein Maß für die Erleichterung der CO<sub>2</sub>-Diffusion durch verschiedene Membranausstattung der Hefen.

Von Platte wurde eine Hefekolonie in 40 ml SC-Selektionsmedium mit Glukose überführt und bei 30 °C über Nacht angezogen. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt und die Zellen bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit 40 ml galaktosehaltigem SC Induktionsmedium (sowie parallel als Kontrolle mit glukosehaltigem SC Medium) auf eine OD<sub>600</sub> = 0,4 eingestellt und über Nacht bis auf eine OD<sub>600</sub> = 1 angezogen. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 3 ml destilliertem Wasser resuspendiert und die Zellen bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml CO<sub>2</sub> Ladepuffer resuspendiert und für ca. 8 min bei 30 °C, 150 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 5 ml eiskaltem CO<sub>2</sub> Inkubationspuffer resuspendiert, bei 1500 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Eine Beladung der Zellen mit FDA zeigt sich durch eine gelbe Farbe des Pellets. Für den Versuch in der Stopped-Flow wurde das Pellet in 1,5 – 5 ml Inkubationspuffer resuspendiert und direkt verwendet.

Komponente	Konzentrationen
Hepes/NaOH pH 7,0	25 mM
NaCl	75 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Mit HCl auf pH 6 einstellen	
Autoklavieren und Lagerung bei RT	

**Tabelle (5.46) Zusammensetzung CO<sub>2</sub> Inkubationspuffer**

Komponente	Konzentrationen
Hepes/NaOH pH 7,0	50 mM
2-deoxy-D-Glukose	5 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und Lagerung bei RT	
Kurz vor Gebrauch 1:100 FDA (5 mM) hinzugeben	

**Tabelle (5.47) Zusammensetzung CO<sub>2</sub> Ladepuffer**

Komponente	Konzentrationen
Hepes/NaOH pH 7,0	25 mM
Natriumhydrogencarbonat	75 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Am Vortag ansetzen und kurz vor der Messung auf pH 6 einstellen	

**Tabelle (5.48) Zusammensetzung CO<sub>2</sub> Mischpuffer**

Komponente	Konzentrationen
Fluoreszeindiacetat	5 mM
DMSO	ad
Lichtgeschützt bei RT lagern	

**Tabelle (5.49) Zusammensetzung Fluoreszeindiacetat-Lösung (FDA)**

### **CO<sub>2</sub> Permeabilitätskoeffizient (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) der Plasmamembran von *S. cerevisiae* Zellen**

Die mit der Stopped-Flow gemessenen Kurven wurden mit Algorithmus 6 auf Seite 103 mittels des Programmes "R" gefittet. Die ermittelte Reaktionskonstante (k) wurde benutzt, um mittels des Algorithmus 8 (auf der nächsten Seite) den Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub> [ms<sup>-1</sup>]) zu ermitteln. Hierbei wurden folgende Werte verwendet: Reaktionskonstante (k), Volumen Hefezelle (V<sub>O</sub> = 2,0944\*10<sup>-17</sup> m<sup>3</sup>), Oberfläche Hefezelle (S<sub>O</sub> = 3,6745\*10<sup>-11</sup> m<sup>2</sup>), pK<sub>a</sub> von Kohlensäure (pK<sub>a</sub> = 6,5), intrazellulärer pH (pH<sub>f</sub> = 6,27), nach Pede (2008).

$$P_{CO_2} = k * \frac{10^{(pH_f - pK_a)}}{(\frac{S_0}{V_0})}$$

#### **Algorithmus (8) Formel für die Berechnung des Permeabilitätskoeffizient für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>)**

Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten für CO<sub>2</sub> (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) benutzt das Volumen der Hefezelle (V<sub>O</sub>) sowie deren Oberfläche (S<sub>O</sub>), den pK<sub>a</sub> von Kohlensäure und den pH im Inneren der Hefezellen pH<sub>f</sub>, Formel nach Yang et al. (2000).

#### **5.5.6.4 Stopped-Flow Spektrometrie Einstellungen**

Bei den Messungen wurden folgende Einstellungen gewählt:

Hardware Einstellungen:

- Power Supply: 150 Watt
- Spektrometer (Streulichtmessungen):  $\lambda$  436 nm
- Spektrometer (Fluoreszenzmessungen):  $\lambda_{\text{ex}} = 490$  nm,  $\lambda_{\text{em}} \geq 515$  nm,
- Kühleinheit: 10 °C
- PMS-settings, Filter: 300  $\mu$ s

Software Einstellungen:

- "total volume per shot": 100  $\mu$ l
- "total flow rate": 10 ml s<sup>-1</sup>
- "Sampling rate" & "datapoints":
  - 200  $\mu$ s & 4000
  - 2 ms & 2000
  - 20 ms & 1000

## **5.6 Methoden mit Pflanzen**

### **5.6.1 Anzuchtbedingungen *Cleome gynandra***

Die Keimung der Samen erfolgte bei 30 °C auf mit Wasser getränktem Filterpapier für 24 - 48 h. Danach wurden die gekeimten Samen auf einem 3:1 P-Erde : Sand-Gemisch ausgebracht und die Pflanzen bei einer Photoperiode von 16 h (350  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PFD, Temp. 24 °C, relative Luftfeuchte 65 %) sowie einer Dunkelperiode von 8 h (0  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> PFD, Temp. 20 °C, relative Luftfeuchte 65 %) kultiviert.



## **5.6.2 “Biolistic Transformation”**

### **5.6.2.1 “Microcarrier” Vorbereitung**

6 mg Goldpartikel (1  $\mu\text{m}$  Durchmesser; Biorad) wurden abgewogen. Zugabe von 1 ml 70 % EtOH und vortexen für 3 - 5 min. Inkubation für 15 min. Mikropartikel wurden für 5 sec abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Partikel wurden 3 mal gewaschen, indem 1 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  zugegeben wurde, das Ganze für 1 min gevortext und die Probe dann für 1 min sich absetzen lassen. Mikropartikel wurden für 2 sec abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  50 % steriles Glycerol zugegeben (End-Konz.: 60 mg/ ml). Die Partikel wurden bei Raumtemperatur für bis zu 2 Wochen vor Gebrauch gelagert.

### **5.6.2.2 Beschichtung der “Microcarrier” mit DNS.**

Die Microcarrier wurden für 5 min gevortext. Danach wurden 50  $\mu\text{l}$  (3 mg) der Microcarrier entnommen und weiter gevortext. Danach wurde zu den Microcarriern 0,5 pmol DNS, 50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2,5 M), 20  $\mu\text{l}$  Spermidin (0,1 M) gegeben und der Ansatz für 2 - 3 min gevortext. Es wurde 1 min gewartet bis sich die Microcarrier abgesetzt hatten. Danach wurden die Partikel für 2 sec abzentrifugiert und die Flüssigkeit abgenommen. Es wurden 140  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol zugegeben, ohne das Pellet aufzuwirbeln. Es wurden 48  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol zugegeben und die Partikel sanft resuspendiert, indem das Reaktionsgefäß vorsichtig geklopft und bei niedriger Geschwindigkeit gevortext wurde. Es wurden jeweils 6 x 6  $\mu\text{l}$  Aliquots in die Mitte eines Macrocarrier pipettiert und über die Mitte auf einer Fläche von ca. 1  $\text{cm}^2$  verteilt. Der Alkohol verdampfte unter sterilen Bedingungen.

### **5.6.2.3 “Biolistic bombardment”**

Die mit DNS beschichteten Microcarrier auf den Macrocarrier wurden verwendet, um mittels des “PDS-1000/ He Particle Delivery System” (Fa. Bio-Rad) Zwiebelchuppen 3 mal bei 1100 psi zu beschießen. Das Pflanzenmaterial wurde 6 cm vom “stopping screen” entfernt positioniert. Die weitere Vorgehen folgte den Anweisungen für die Verwendung des PDS-1000/ He Particle Delivery System der Fa. Bio-Rad. Nach dem Bombardement wurde das Gewebe in einer Wachstumskammer bei 22 °C 24 - 48 h kultiviert und danach mikroskopiert.

## **5.6.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Mittels konfokaler Mikroskopie kann ein begrenzter Bereich auf einer Probe mit Anregungslicht bestrahlt werden um in diesem Bereich Fluoreszenz zu detektieren. Durch eine erste Lochblende im Anregungsstrahlengang wird ein Laserstrahl zu einer punktförmigen Lichtquelle reduziert. Diese Punktlichtquelle wird auf die Objektebene fokussiert. Mittels einer zweiten Lochblende in der Zwischenbildebene trifft nur Licht aus dem Fokusbereich des Anregungslichtes auf den Detektor. Das Anregungslicht wird an einem dichroitischen Strahlteiler reflektiert und dann durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Die Probe emittiert nach Anregung Fluoreszenz, die wiederum durch das Objektiv gesammelt und vom Dichroit durchgeleitet wird. Fluoreszenzlicht der Probe außerhalb des Fokusses wird

durch die Lochblende reduziert oder ausgeschlossen. Dies ist möglich, da das emittierte Licht langwelliger als das Anregungslicht ist. Die nachfolgende Tubus-Linse fokussiert das transmittierte Licht auf die zweite Lochblende. Als Mikroskop wurde eine Leica DM IRB/E verwendet. Als Objektiv wurde HCX PL APO 100x/ 1,4 - 0,7 oil verwendet.

#### 5.6.4 Virus-induced-gene-silencing

Es wurde (entsprechend der Methode von Liu et al. (2002a, 2012)) eine Übernachtskultur von *A. tumefaciens* LBA4404 mit pTRV1, pTRV2, pTRV2\_CgPDS, pTRV2\_NbPDS angesetzt. Hiervon wurde jeweils 1 ml verwendet, um 50 ml VIGS-Anzuchtmedium anzupflanzen. Die Kultur wurde bei 28 °C, 200 rpm über Nacht kultiviert, die Zellen am Folgetag bei 1500 g, 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Pellet im Infiltrationsmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 2,0 gebracht. Die Zellen wurden danach für 3 h bei RT inkubiert. Die Agrobaktériensuspension wurde infiltriert, indem mit einer Nadel die Oberseite eines Blattes der zu transformierenden Pflanze perforiert wurde und danach mit einer 1 ml Spritze ohne Nadel die Lösung in die Interzellularen gedrückt wurde. Hierfür wurden ca. 14 Tage alte Pflanzen (entsprechend Burch-Smith et al. (2006) bei VIGS mit *Arabidopsis*) von *N. benthamiana* und *C. gynandra* verwendet. Die Pflanzen wurden für 24 h in Plastiktüten gesteckt und hiernach im Gewächshaus weiter kultiviert.

Komponente	Konzentrationen
Kanamycin	50 µg/ ml
Streptomycin	100 µg/ ml
MES	10 mM
Acetosyringon	20 µM
LB Medium	ad
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.50) Zusammensetzung VIGS-Anzuchtmedium**

Komponente	Konzentrationen
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MES	10 mM
Acetosyringon	200 µM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.51) Zusammensetzung Infiltrationsmedium**

Komponente	Konzentrationen
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MES pH 5,6	10 mM
Acetosyringon	150 µM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei RT lagern	

**Tabelle (5.52) Zusammensetzung Agrobacterium Inokulationsmedium**

### 5.6.5 Isolation genomischer DNS aus Pflanzen

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Es wurden 200 mg der Proben in flüssigem N<sub>2</sub> gemörst. Hierbei wurde auf eine vollständige Kühlung bei allen Schritten und allen verwendeten Werkzeugen geachtet. Das Pflanzenpulver wurde in einem gekühlten 2 ml Reaktionsgefäß mit 750 µl Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform gevortext. Die Proben wurden für 30 min bei 65 °C inkubiert und der entstehende Druck im Reaktionsgefäß ausgeglichen. Die Proben wurden für 10 min bei 7500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 10 min bei 15k x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70 % EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Präzipitat in 200 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Es wurden 6 µl RNase A (Stock: 10 µg/ µl) zugegeben und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurden 400 µl 100 % EtOH sowie 20 µl 3 M NaOAc zugegeben und die Lösung mehrfach invertiert und danach für 2 h bei -20 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 15k x g, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Komponente	Konzentrationen
N-Lauroylsarcosin	1 % (w/v)
CTAB	0,8 % (w/v)
Tris/ HCl (pH 7,8)	220 mM
NaCl	800 mM
EDTA	22 mM
Mannitol	140 mM
dH <sub>2</sub> O	ad
Autoklavieren und bei RT lagern	
Vor Gebrauch Mercaptoethanol (1,4 µl/ ml Puffer) zugeben	

**Tabelle (5.53) Extraktionspuffer genomische DNS**

### 5.6.6 Gaswechsellmessungen

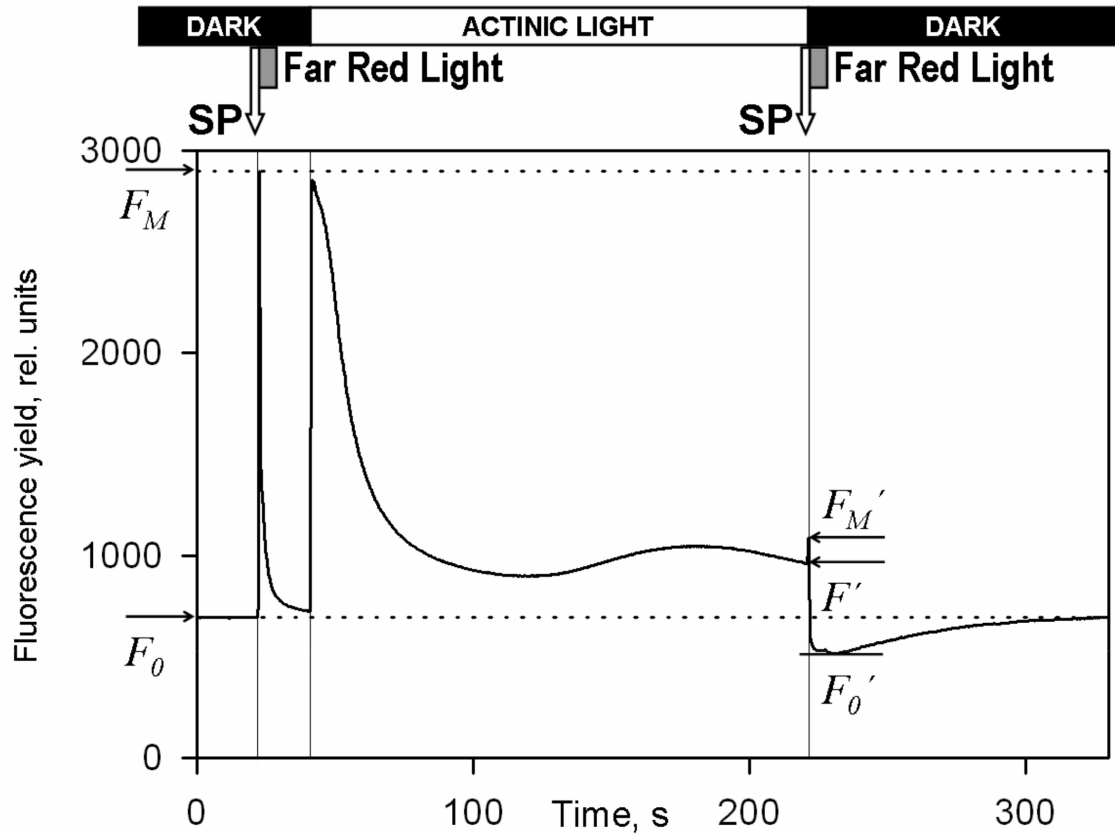
Für die Gaswechsellmessungen wurde das GFS 3000 Portable Gas Exchange Fluorescence System (Walz) mit dem Standard Messkopf 3010S verwendet. Diese ermöglicht, verschiedenes Pflanzenmaterial unter verschiedenen Licht- und Gasbedingungen auf Ihre Photosyntheseigenschaften hin zu untersuchen. So können die Konzentrationen von Wasserdampf und CO<sub>2</sub> eingestellt und Ihre Änderung nach Passieren der Messküvette gemessen werden.

Bei den Gaswechsel- und Fluoreszenzmessungen werden verschiedene Parameter aus den Konzentrationen der Gase und Fluoreszenzwerten bestimmt. Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurde Algorithmus 9 benutzt. Das Prinzip der hierfür durchgeführten Fluoreszenzmessungen ist in Abbildung 5.2 (auf der nächsten Seite) wiedergegeben.

$$Y_{II} = \frac{Fm' - F'}{Fm'}$$

#### **Algorithmus (9) Quantenausbeute Photosystem II (PS<sub>II</sub>)**

Formel nach Genty et al. (1989). Bestimmt wird die effektive photochemische Quantenausbeute des Photosystem II der Pflanzen (**Y<sub>II</sub>**). Dies geschieht durch Auswertung von Fluoreszenzdaten. **Fm'** ist hierbei die Fluoreszenz des beleuchteten Blattes während eines sättigenden Lichtpulses. Hierdurch werden die maximalen Fluoreszenzniveaus bestimmt die während eines sättigender Lichtpulses auftritt. Hierbei werden alle Reaktionszentren des PS<sub>II</sub> "geschlossen". Der Wert von **F'** wird bestimmt durch die Position der Induktionskurve vor einem sättigenden Lichtpuls. Er spiegelt somit die Fluoreszenz des gemessenen Pflanzengewebes in actinischem Licht dar.



**Abbildung (5.2) Prinzip der Fluoreszenzmessung**

Dargestellt ist das Prinzip einer Fluoreszenzmessung und die resultierenden Fluoreszenzwerte. Gezeigt ist eine Messung an Dunkel- und Lichtadaptierten Blättern durch Einstrahlung eines sättigenden Lichtpulses (SP) und die resultierende Veränderung in der gemessenen Fluoreszenz. Hierbei werden unter anderem Werte wie  $F_M$  und  $F'$  bestimmt die zur Bestimmung der Quantenausbeute dienen. Darstellung aus dem Handbuch jpm\_071206 der FA. Walz.

Die Werte der Quantenausbeute kann für die Bestimmung der Elektronentransportrate (ETR) herangezogen werden. Hierfür wurde Algorithmus 10 verwendet.

$$ETR = Y_{II} * PAR / 2 * \text{ETR-Faktor}$$

**Algorithmus (10) Elektronentransportrate (ETR)**

Die Elektronentransportrate (**ETR**,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gibt den Elektronentransport durch das PS<sub>II</sub> wieder. PAR ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ist ein Maß für die Lichtintensität. Es wird angenommen, dass die Lichtabsorption gleichmäßig zwischen Photosystem I und II aufgeteilt ist. Der **ETR-Faktor** spiegelt den Anteil der durch die Photosysteme absorbierten Lichtes wieder.

Das in Algorithmus 10 verwendete PAR (eng.: photosynthetic active radiation,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ist ein Maß für die Lichtintensität die für photochemische Vorgänge nutzbar ist.

Hierbei wurde bei der verwendeten Lichtquelle Strahlung von 90 % im roten ( $\lambda = 640 \text{ nm}$ ) und 10 % im blauen ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) Spektrum genutzt. Als ETR-Faktor wurde für die Messungen ein Wert von 0,84 verwendet. Parallel konnte, neben der Ermittlung von Fluoreszenzdaten, auch Veränderung in der Konzentrationszusammensetzung des - das Blatt umgebende - Gasgemisches bestimmt werden. Dieses wurde verwendet um mittels Algorithmus 11 die Assimilationsrate von  $\text{CO}_2$  durch das Blatt zu bestimmen.

$$A = \frac{u_e * (c_e - c_o)}{LA} - E * c_o$$

**Algorithmus (11) Assimilationsrate (A)**

Formel nach von Caemmerer und Farquhar (1981). **A** ist die Assimilationsrate von  $\text{CO}_2$  (in  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), **ue** gibt die molare Flussrate am Einlass der Küvette wieder (in  $\mu\text{mol s}^{-1}$ ), **co** gibt den  $\text{CO}_2$ -Stoffmengenanteil am Auslass der Küvette wieder (in ppm), **ce** gibt den  $\text{CO}_2$ -Stoffmengenanteil am Einlass der Küvette wieder (in ppm), **LA** bezeichnet die Blattfläche (in  $\text{cm}^2$ ), **E** gibt die Transpirationsrate (in  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) wieder. Sie wird aus Flussrate am Einlass der Küvette, der Änderung in der  $\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration sowie der Blattfläche berechnet.

Es wurden jeweils  $3 \text{ cm}^2$  Blattfläche eingespannt und die Wasserdampfkonzentration auf 16,5k ppm eingestellt. Die Temperatur in der Küvette war auf  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt. Die Gaswechsellmessungen wurde an 28 Tage alten Pflanzen durchgeführt. Bei Lichtmessungen wurden jeweils 10 Lichtintensitäten bei konstanter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (380 ppm) gemessen. Die Messungen starteten bei  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und endeten bei  $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die Messung hatte eine Kalibrationsphase für 30 min am Anfang der Messungen. Es wurden jeweils als Messpunkt drei Datenpunkten aufgezeichnet. Die Adaption der Pflanze zwischen den verschiedenen Lichtintensitäten war 5 min.

Bei Messungen der Veränderung der Assimilationsrate bei Veränderung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration wurden jeweils  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen von 380 ppm bis 70 ppm und von 380 ppm bis 1500 ppm gemessen. Die Messungen hatte eine Kalibrationsphase für 30 min am Anfang der Messungen. Es wurden jeweils als Messpunkt drei Datenpunkten aufgezeichnet. Die Zeit zwischen den verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen war 6 - 9 min abhängig von der Geschwindigkeit der Messapparatur bei der Einstellung der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen.

Die Daten wurden von dem an den Messapparatur angeschlossenen Computer unter Verwendung der Software von Walz WinControl V3.22 aufgezeichnet. Die Kurvenanpassung erfolgte mit der Mitscherlich Gleichung (siehe Algorithmus 12 (auf der nächsten Seite)).

$$A_N = A_{max} * \left(1 - e^{-A_{qe} * (PPF - LCP)}\right)$$

### Algorithmus (12) Mitscherlich Gleichung

Gleichung zur Anpassung an ökophysiologische Antwortkurven nach Potvin und Lechowicz (1990). Hierbei werden an die vorliegenden Gaswechseldaten die lichtgesättigte Photosyntheserate ( $A_{max}$ ), der lineare Anstieg, der die schnelle Reaktion der Netto Photosyntheserate ( $A_N$ ) bei niedrigen PAR wiedergibt ( $A_{qe}$ ) angepasst. Weiterhin wird der Lichtkompensationspunkt (LCP) ermittelt. Sowohl  $A_N$  als auch der photosynthetischer Photonenfluss (PPF) sind aus den Datensätzen gegeben.

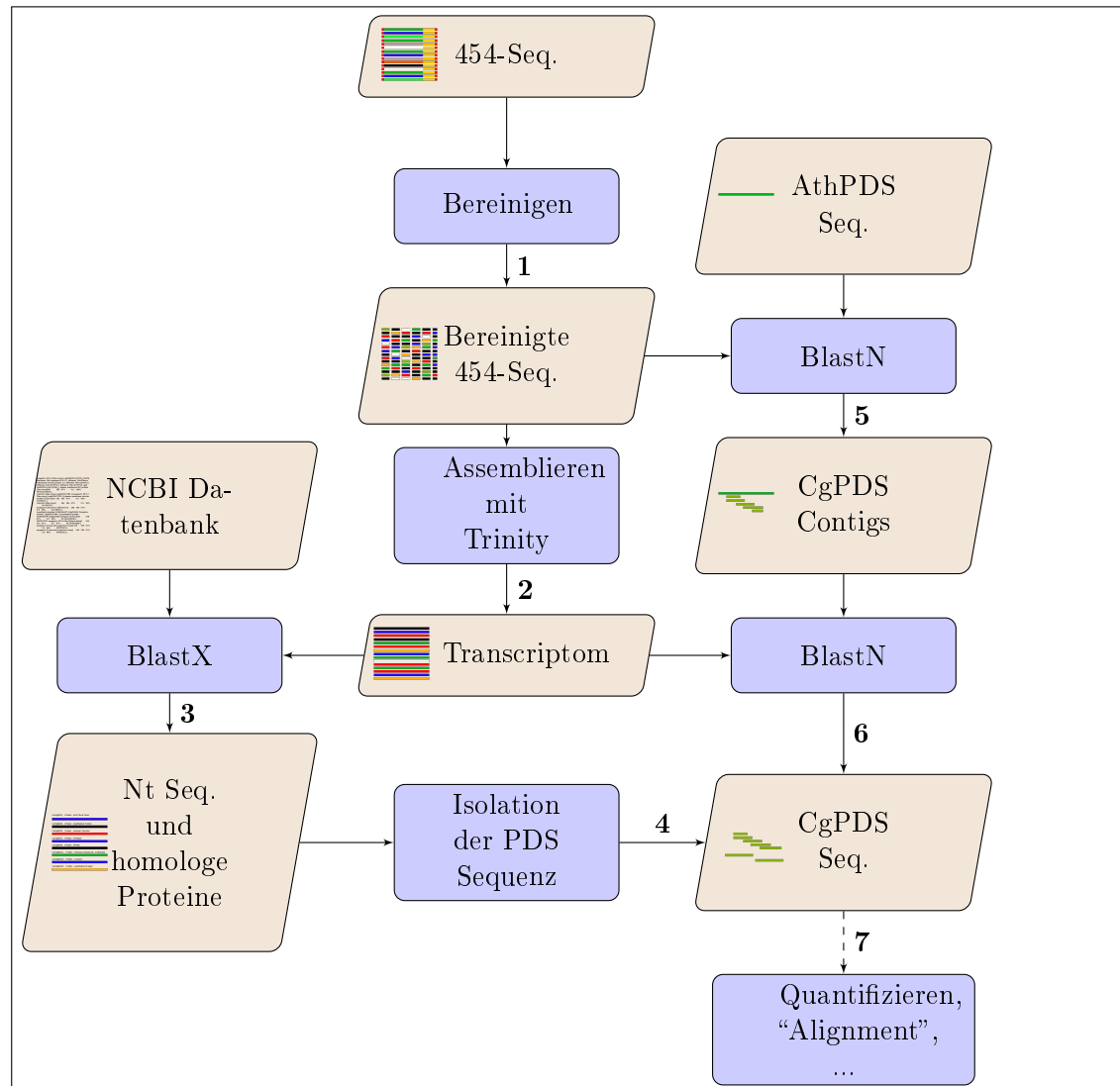
Die Bestimmung statistischer Parameter erfolgte über das Programm “R” (Version 2.15.1). Die Parameter der Mitscherlich-Gleichung wurden unter Verwendung der Methode “nls” (“Nonlinear Least Squares”) bestimmt. Die Prüfung der Normalverteilung der Daten sowie die Durchführung der t-Tests sowie die Auftragung der Daten wurde ebenso mit Methoden von “R” durchgeführt.

## 5.7 Bioinformatische Methoden

Um unbekannte Sequenzen aus 454-Sequenzierungen zu identifizieren, müssen diese Datensätze aufbereitet und umgewandelt werden. Danach erfolgt die Erstellung eines Transkriptoms. Dieses kann mittels automatisiertem BLAST gegen bekannte kodierende Sequenzen (eng.: coding sequence, CDS) abgeglichen werden. Es kann damit eine Proteinindatenbank erstellt werden, die den Sequenzen aus dem Transkriptom entsprechende bekannte Proteinsequenzen zuordnet. Diese Proteinsequenzdatenbank kann nun nach einer gesuchten Proteinsequenz durchsucht und die passende Sequenz aus dem Transkriptom identifiziert werden. Weiterhin können bekannte Nukleotidsequenzen mittels BLAST gegen das Transkriptom abgeglichen werden, um Ähnlichkeiten auf Nukleotidebene zu identifizieren. Die so gefundenen Sequenzen können gegeneinander abgeglichen werden um sowohl Ähnlichkeiten auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene abzudecken.

Das Gesamte Vorgehen ist in Abbildung 5.3 (auf der nächsten Seite) schematisch dargestellt. **(1)** Ausgangspunkt der Bearbeitung war die Adapter- und Qualitätsbereinigte 454-Sequenzierung. **(2)** Diese wurde mittels Trinity zu einer Transcriptom-Datei assembliert zur Erstellung längerer Contigs (Haas et al. (2013)). **(3)** Die Contigs wurden mittels BlastX bekannten Proteinen zugeordnet. Aus der Liste der Proteine wurden nun alle Nukleotidsequenzen, die eine Phytoendesaturase kodieren, isoliert **(4)**. Auf diese Weise wurden Sequenzen identifiziert, die bekannten PDS-Sequenzen entsprachen. Um nun auch Sequenzen zu identifizieren, die durch die Filtermechanismen von **(1 - 4)** durchgefallen, wurden **(5)** die 454-Sequenzen in einem BlastN gegen die Sequenz von AthPDS align, und entsprechende Sequenzen isoliert. **(6)** Diese wurden gegen den Trinitydatensatz align, um längere Sequenzabschnitte zu isolieren die auf Nukleotidebene keine hohe Ähnlichkeit zu AthPDS besitzen. Die in **(4 und 6)** identifizierten PDS Sequenzen wurden quantifiziert und auf überlappende Sequenzen hin untersucht. Damit wurde die

zur Klonierung verwendete CgPDS Sequenz erstellt (7). Analog hierzu wurden die Sequenz von CsPDS isoliert. Beige farbige Kästen kennzeichnen Sequenzen. Blaue Kästen kennzeichnen Bearbeitungsschritte mit Programmen.



**Abbildung (5.3) Bioinformatisches Vorgehen zur Identifizierung von CgPDS**

(1) Adapter- und Qualitätsbereinigte 454-Sequenzierung, (2) Transcriptom (erstellt mit Trinity), (3) Homologe Proteine (mit BlastX), (4) Isolation von Phytoene Desaturase Sequenzen, (5) "Contigs", die homolog zu Phytoene Desaturase Sequenzen zu *A. thaliana* sind (mit BlastN), (6) Sequenzen im Transcriptom mit Ähnlichkeit zu kürzeren "Contigs", (7) Quantifizierung, "Alignment" und Assemblierung von CgPDS Sequenzen.

Frei verfügbare 454-Sequenzierungsdaten von *C. gynandra* und *C. spinosa*<sup>1</sup> wurden

<sup>1</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX004115> ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX004114>



heruntergeladen und vom \*.sra Format in das \*.fastq Format mit dem Programm fastq-dump<sup>2</sup> umgewandelt. Zum Entfernen von Adaptersequenzen sowie Sequenzdaten mit unzureichender Qualität wurden die Programme fastq\_quality\_trimmer sowie fastx\_trimmer des fastx toolkit 0.0.13<sup>3</sup> benutzt. Das Trimmen der Sequenzdaten wurde mit dem Programm fastqc<sup>4</sup> überprüft. Hierbei wurde insbesondere auf überrepräsentierte Sequenzen geachtet.

Es wurden nur solche Sequenzen verwendet, deren Median mindestens einem “Phred Quality score” von 30 entsprach. Der “Phred Quality score” (Q) ist ein Maß für die Fehlerwahrscheinlichkeit (P) bei der Bestimmung der Identität eines Nucleotids bei einer DNS-Sequenzierung.

$$P = 10^{-\frac{Q}{10}} \quad (5.4)$$

bzw.

$$Q = -10 * \log_{10} * P \quad (5.5)$$

Bei dem verwendeten Wert von 30 beträgt der Median der Chance, dass die Base bei der Sequenzierung inkorrekt bestimmt wurde 0,001 %. Konservativer wäre es, nur Sequenzbereiche mit einem Quantil  $Q_{0,25}$  mit einem Phred Quality score über 30 zu wählen, da bei den vorliegend, nicht normal-verteilten Daten die Quantile extreme Unterschiede im Abstand zum Median aufweisen können. Bei der durchgeführten Analyse wurde die weniger konservative Methodik gewählt, da das vorliegende Quantil  $Q_{0,25}$  bei Position 229 bp mit einem Wert von 24 noch als ausreichend angesehen wurde.

Alle anderen Sequenzabschnitte wurden verworfen. Für Folgeschritte wurden die FASTQ Dateien in das FASTA Format mittels des Programms fastq\_to\_fasta des fastx toolkits<sup>5</sup> umgewandelt. Aus den Sequenzdaten wurde mittels des Programmes Trinity<sup>6</sup> eine Transkriptomdatei erstellt.

### 5.7.0.1 Automatisierter BLAST

Es wurde eine Transkriptom Datenbank mittels “makeblastdb” des Softwarepaketes ncbi-blast-2.2.25+<sup>7</sup> erstellt. Diese Transkriptom Datenbank diente zum stand-alone BLASTx des Transkriptoms mittels ncbi-blast-2.2.25+. Es wurde mittels Python Skripts aus den BLASTx Ergebnissen Text aus der Ausgabedatei entfernt, der für die Weiterverarbeitung ohne Belang war. Weiterhin erfolgte eine Umformatierung des Textes, um eine Zuordnung der BLASTx Ergebnisse zu den entsprechenden Sequenzen der Transkriptomdatei zu erreichen. Weiterhin wurden mittels stand-alone BLASTn Sequenzen von *Arabidopsis* gegen die Transkriptomdateien abgeglichen.

Es wurden diejenigen BLASTx Treffer isoliert, die bestimmte Schlagwörter enthalten (z.B. “phytoene desaturase”). Dies erfolgte mittels BASH Skript. Diese wurden in einer Datei gespeichert und nicht benötigte Metadaten mittels Python Skriptes entfernt.

<sup>2</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47540/>

<sup>3</sup>[http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)

<sup>4</sup><http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

<sup>5</sup>[http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)

<sup>6</sup><http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>

<sup>7</sup><http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

#### **5.7.0.2 Quantifizierung von der Transkripte**

Um die Ergebnisse des eingegrenzten BLASTx zu quantifizieren, sollten diese ausgehend von ihrer Ähnlichkeit sortiert und ausgezählt werden. Hierfür wurden die Ergebnisse in eine \*.fasta Datei umgewandelt und aus diesen mittels “makeblastdb” des Softwarepaketes ncbi-blast-2.2.25+ eine Datenbank erstellt. Mittels dieser Datenbank mit den gesuchten Sequenzen wurde ein BLASTn gegen die Transkriptomdatenbank durchgeführt. Die Ausgabe des besten Treffers mit einem E-Value von höchstens 0,01 erfolgte in eine Datei und die Quantifizierung der gefundenen Sequenzen wurde mittels Python Skripts durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Bestimmung der Häufigkeit einer Sequenz als reads per million bzw. reads per million per length.

#### **5.7.0.3 Ausschluß ungewollter Nebenreaktionen**

Die Sequenzen der PDS wurden assembliert. Die Sequenz der PDS wurde mittels Pythonskript in alle möglichen 21-mere unterteilt. Diese Sequenzen wurden mittels “makeblastdb” des Softwarepaketes ncbi-blast-2.2.25+ in eine Datenbank umgewandelt. Diese Datenbank wurde verwendet, um einen entsprechenden BLASTn mit ncbi-blast-2.2.25+ gegen die Trinity Datenbank vorzunehmen. Die Ergebnisse wurden nach Treffern durchforstet und die entsprechenden Sequenzen identifiziert und abgeglichen, um welche putativen CDS es sich handelt.

# Literaturverzeichnis

- Markus Albert. Studien zur Interaktion des pflanzlichen Parasiten *Cuscuta reflexa* mit dem inkompatiblen Wirt *Lycopersicon esculentum*. PhD thesis, TU Darmstadt, November 2005. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/629/>.
- K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, und T. Schwede. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2):195–201, Jan 2006.
- Brian J. Atwell, Paul E. Kriedemann, und Colin G.N. Turnbull. *Plants in action*. Macmillan Education Australia Pty Ltd, 1999.
- R. Bassi und C. Passera. Effect of growth conditions on carboxylating enzymes of *Zea mays* plants. *Photosynthesis Research*, 3:53–58, 1982. doi: 10.1007/BF00030049.
- A. Bertl und R. Kaldenhoff. Function of a separate NH<sub>3</sub>-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Lett.*, 581(28):5413–5417, Nov 2007.
- A. Bräutigam, K. Kajala, J. Wullenweber, M. Sommer, D. Gagneul, K. L. Weber, K. M. Carr, U. Gowik, J. Mass, M. J. Lercher, P. Westhoff, J. M. Hibberd, und A. P. Weber. An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species. *Plant Physiol.*, 155(1):142–156, Jan 2011.
- N. J. Brown, C. A. Newell, S. Stanley, J. E. Chen, A. J. Perrin, K. Kajala, und J. M. Hibberd. Independent and parallel recruitment of preexisting mechanisms underlying C4-photosynthesis. *Science*, 331(6023):1436–1439, Mar 2011.
- T. M. Burch-Smith, M. Schiff, Y. Liu, und S. P. Dinesh-Kumar. Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 142(1):21–27, Sep 2006.
- Sarah J. C. da Silva, Gloria P. Castillo-Urquiza, Braz T. Hora Junior, Iraildes P. Assuncao, Gaus S. A. Lima, Gilvan Pio-Ribeiro, Eduardo S. G. Mizubuti, und F. Murilo Zerbini. High genetic variability and recombination in a begomovirus population infecting the ubiquitous weed *Cleome affinis* in northeastern brazil. *Archives of Virology*, 156(12):2205–2213, 2011.
- Boonsong Ekpong. Effects of seed maturity, seed storage and pre-germination treatments on seed germination of *cleome* (*Cleome gynandra* L.). *Scientia Horticulturae*, 119(3): 236–240, Feb 2009.

- V. Endeward, R. Musa-Aziz, G. J. Cooper, L. M. Chen, M. F. Pelletier, L. V. Virkki, C. T. Supuran, L. S. King, W. F. Boron, und G. Gros. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO<sub>2</sub> transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J.*, 20(12):1974–1981, Oct 2006.
- J. R. Evans, R. Kaldenhoff, B. Genty, und I. Terashima. Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *J. Exp. Bot.*, 60(8):2235–2248, 2009.
- Kerstin Fileschi. Charakterisierung des *Arabidopsis thaliana* Aquaporins AtNIP1;1. PhD thesis, TU Darmstadt, May 2008. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/1001/>.
- Matthias Fischer. Untersuchungen zur Modifikation von Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum*. PhD thesis, TU Darmstadt, December 2007. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/909/>.
- Bernard Genty, Jean-Marie Briantais, und Neil R. Baker. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1):87 – 92, 1989. ISSN 0304-4165. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416589800169>.
- N. Guex und M. C. Peitsch. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15):2714–2723, Dec 1997.
- B. J. Haas, A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P. D. Blood, J. Bowden, M. B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M. D. Macmanes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C. N. Dewey, R. Henschel, R. D. Leduc, N. Friedman, und A. Regev. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*, 8(8):1494–1512, Aug 2013.
- Marlies Heckwolf. Funktionelle Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana* Aquaporine AtPIP1;2 und AtPIP2;3. PhD thesis, TU Darmstadt, February 2010. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/2042/>.
- T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, und S. Mitaku. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*, 14(4):378–379, 1998.
- X. Huang und W. Miller. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, 12:373–381, 1991.
- H. Inoue, H. Nojima, und H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1):23–28, Nov 1990.
- D. J. Korbie und J. S. Mattick. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*, 3(9):1452–1456, 2008.

- N. K. Koteyeva, E. V. Voznesenskaya, E. H. Roalson, and G. E. Edwards. Diversity in forms of C4 in the genus *Cleome* (Cleomaceae). *Ann. Bot.*, 107(2):269–283, Feb 2011.
- E. Kruse, N. Uehlein, and R. Kaldenhoff. The aquaporins. *Genome Biol.*, 7(2):206, 2006.
- M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, Nov 2007.
- Richard C. Leegood. C4 photosynthesis: principles of CO<sub>2</sub> concentration and prospects for its introduction into C3 plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(369):581–590, 2002. doi: 10.1093/jexbot/53.369.581. URL <http://jxb.oxfordjournals.org/content/53/369/581.abstract>.
- H. Liu, D. Fu, B. Zhu, H. Yan, X. Shen, J. Zuo, Y. Zhu, and Y. Luo. Virus-induced gene silencing in eggplant (*Solanum melongena*). *J Integr Plant Biol*, 54(6):422–429, Jun 2012.
- Y. Liu, M. Schiff, and S. P. Dinesh-Kumar. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.*, 31(6):777–786, Sep 2002a.
- Y. Liu, M. Schiff, R. Marathe, and S. P. Dinesh-Kumar. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.*, 30(4):415–429, May 2002b.
- S. P. Long and C. J. Bernacchi. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.*, 54(392):2393–2401, Nov 2003.
- D. M. Marshall, R. Muhaidat, N. J. Brown, Z. Liu, S. Stanley, H. Griffiths, R. F. Sage, and J. M. Hibberd. *Cleome*, a genus closely related to *Arabidopsis*, contains species spanning a developmental progression from C(3) to C(4) photosynthesis. *Plant J.*, 51(5):886–896, Sep 2007.
- M. Matsuoka, R. T. Furbank, H. Fukayama, and M. Miyao. Molecular engineering of C4 photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:297–314, Jun 2001.
- A. Missner, P. Kugler, S. M. Saparov, K. Sommer, J. C. Mathai, M. L. Zeidel, and P. Pohl. Carbon dioxide transport through membranes. *J. Biol. Chem.*, 283(37):25340–25347, Sep 2008.
- R. Muhaidat, R. F. Sage, and N. G. Dengler. Diversity of Kranz anatomy and biochemistry in C4 eudicots. *Am. J. Bot.*, 94(3):362–381, Mar 2007.
- Nadine Pedé. Untersuchungen zur CO<sub>2</sub>-Leitfähigkeit pflanzlicher Aquaporine im heterologen Hefesystem. PhD thesis, TU Darmstadt, July 2008. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/1035/>.

- C. Potvin und M.J. Lechowicz. The statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology*, 71:1389–1400, 1990.
- A. Purkayastha und I. Dasgupta. Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 47(11-12):967–976, 2009.
- S. K. Raj, S. K. Snehi, M. S. Khan, A. K. Tiwari, und G. P. Rao. Detection of ageratum enation virus from cat’s whiskers (*Cleome gynandra* L.) with leaf curl symptoms in India. *Journal of General Plant Pathology*, 76(4):292–294, 08 2010.
- E. Romanowska und A. Drozak. Comparative analysis of biochemical properties of mesophyll and bundle sheath chloroplasts from various subtypes of C4 plants grown at moderate irradiance. *Acta Biochim. Pol.*, 53(4):709–719, 2006.
- Rowan F. Sage, Marshall D. Hatch, Ryuzi Kanai, Gerald E. Edwards, Richard C. Lee-good, Robert P. Walker, Nancy G. Dengler, Timothy Nelson, Susanne von Caemmerer, Robert T. Furbank, Steve P. Long, Alan K. Knapp, Ernesto Medina, Scott A. Heckathorn, Samuel J. McNaughton, James S. Coleman, David A. Wedin, Meirong Li, Russel K. Monson, Elizabeth A. Kellogg, Thure E. Cerling, R. Harold Brown, Nikolaas J. van der Merwe, Hartmut Tschauner, Meirong Li, und Russel K. Monson. *C4 plant biology*. ACADEMIC PRESS, 1999.
- M. E. Schranz und T. Mitchell-Olds. Independent ancient polyploidy events in the sister families Brassicaceae and Cleomaceae. *Plant Cell*, 18(5):1152–1165, May 2006.
- T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, und M. C. Peitsch. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3381–3385, Jul 2003.
- Sven Sdorra. Untersuchungen zur Interaktion und Lokalisation von Aquaporinen aus *Nicotiana tabacum*. PhD thesis, TU Darmstadt, Fachbereich Biologie, Angewandte Pflanzenwissenschaften, November 2009. URL <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/1959/>.
- F. Siefritz, A. Biela, M. Eckert, B. Otto, N. Uehlein, und R. Kaldenhoff. The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *J. Exp. Bot.*, 52(363):1953–1957, Oct 2001.
- J. Slavik. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes. *FEBS Lett.*, 140(1):22–26, Apr 1982.
- J. Slavik. Intracellular pH topography: determination by a fluorescent probe. *FEBS Lett.*, 156(2):227–230, Jun 1983.
- M. Sommer, A. Brautigam, und A. P. Weber. The dicotyledonous NAD malic enzyme C4 plant *Cleome gynandra* displays age-dependent plasticity of C4 decarboxylation biochemistry. *Plant Biol (Stuttg)*, 14(4):621–629, Jul 2012.
- N. Uehlein, C. Lovisolo, F. Siefritz, und R. Kaldenhoff. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature*, 425(6959):734–737, Oct 2003.

- N. Uehlein, B. Otto, D. T. Hanson, M. Fischer, N. McDowell, und R. Kaldenhoff. Function of *Nicotiana tabacum* aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell*, 20(3):648–657, Mar 2008.
- N. Uehlein, H. Sperling, M. Heckwolf, und R. Kaldenhoff. The *Arabidopsis aquaporin* PIP1;2 rules cellular CO<sub>2</sub> uptake. *Plant Cell Environ.*, 35(6):1077–1083, Jun 2012.
- T. Unver und H. Budak. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. *Int J Plant Genomics*, 2009:198680, 2009.
- B. Uzilday, I. Turkan, A. H. Sekmen, R. Ozgur, und H. C. Karakaya. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. *Plant Sci.*, 182:59–70, Jan 2012.
- M. P. van Heeswijk und C. H. van Os. Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J. Membr. Biol.*, 92(2):183–193, 1986.
- S. von Caemmerer und G.D. Farquhar. Some relationship between the photochemistry and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153:376–387, 1981.
- E. V. Voznesenskaya, V. R. Franceschi, O. Kiirats, H. Freitag, und G. E. Edwards. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature*, 414(6863):543–546, Nov 2001.
- M. Watanabe, J. Ohnishi, und Kanai R. Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in bundle sheath cells of C4 plants. *Plant & Cell Physiol.*, 25:69–76, 1984.
- A. P. Weber und S. von Caemmerer. Plastid transport and metabolism of C3 and C4 plants—comparative analysis and possible biotechnological exploitation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13(3):257–265, Jun 2010.
- B. Yang, N. Fukuda, A. van Hoek, M. A. Matthay, T. Ma, und A. S. Verkman. Carbon dioxide permeability of aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.*, 275(4):2686–2692, Jan 2000.
- X. Yin, Z. Sun, P. C. Struik, P. E. Van der Putten, W. Van Ieperen, und J. Harbinson. Using a biochemical C4 photosynthesis model and combined gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements to estimate bundle-sheath conductance of maize leaves differing in age and nitrogen content. *Plant Cell Environ.*, 34(12):2183–2199, Dec 2011.
- A. J. Yool und A. M. Weinstein. New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1. *News Physiol. Sci.*, 17:68–72, Apr 2002.

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Vergleich C3- und C4-Photosynthese . . . . .	12
2.2	NAD-ME Typ der C4-Photosynthese . . . . .	15
2.3	Schematische Darstellung der Aquaporinsekundärstruktur . . . . .	16
2.4	<i>C. gynandra</i> und <i>C. spinosa</i> . . . . .	17
2.5	Stammbaum Brassicales . . . . .	18
3.1	Keimungsverhalten von <i>C. gynandra</i> . . . . .	21
3.2	Phänotyp <i>C. gynandra</i> und <i>C. spinosa</i> . . . . .	23
3.3	Lichtkurve von <i>C. gynandra</i> und <i>C. spinosa</i> . . . . .	25
3.4	Lichtkurve von 0 - 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . . . . .	27
3.5	Quantenausbeute und Elektronentransportrate . . . . .	29
3.6	Veränderung der Assimilationsrate (A) von <i>C. gynandra</i> und <i>C. spinosa</i> bei Veränderung der CO <sub>2</sub> -Konzentration . . . . .	31
3.7	Lichtkurve bei 750 ppm CO <sub>2</sub> . . . . .	33
3.8	Northern-Blot auf Gesamt-RNS . . . . .	35
3.9	Nukleotid-Sequenzähnlichkeit von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	37
3.10	Vergleich der Aminosäuresequenz von CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	39
3.11	Sekundärstruktur CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	40
3.12	Tertiär-Struktur CgPIP1;2 und CsPIP1;2 . . . . .	41
3.13	Schwellungskinetiken in Hefeprotoplasten . . . . .	44
3.14	Osmotische Wasserpermeabilität für H <sub>2</sub> O . . . . .	46
3.15	Fluoreszenzkinetik in Hefen . . . . .	49
3.16	Permeabilitätskoeffizienten für CO <sub>2</sub> in Hefezellen . . . . .	51
3.17	Lokalisation mittels mGFP in Zwiebelchuppenzellen . . . . .	53
3.18	FASTQC Ausgabe Beispiel . . . . .	55
3.19	Bioinformatisches Vorgehen zur Identifizierung von CgPDS . . . . .	59
3.20	Klonierung von CgPDS und CsPDS . . . . .	61
3.21	VIGS Effekt . . . . .	62
3.22	Isolation von Pflanzenmaterial . . . . .	63
3.23	Nachweis von pTRV1 . . . . .	64
5.1	Stopped-Flow Spektrometrie . . . . .	101
5.2	Prinzip der Fluoreszenzmessung . . . . .	111
5.3	Bioinformatisches Vorgehen zur Identifizierung von CgPDS . . . . .	114
5.4	Teil-Sequenz CgPDS, sequenziert aus TA-Klon . . . . .	127
5.5	Teil-Sequenz CsPDS, sequenziert aus TA-Klon . . . . .	127



# Algorithmenverzeichnis

1	Mitscherlich Gleichung . . . . .	26
2	Angepasste Mitscherlich Gleichung . . . . .	32
3	Funktion zur Ermittlung Reaktionskonstante in Stopped-Flow-Messungen . . . . .	45
4	Formel für die Osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) . . . . .	45
5	Formel für den Permeabilitätskoeffizient für $CO_2$ ( $P_{CO_2}$ ) . . . . .	50
6	Funktion zur Ermittlung der Reaktionskonstante in Stopped-Flow-Messungen . . . . .	103
7	Formel für die osmotische Wasserpermeabilität ( $P_f$ ) . . . . .	103
8	Formel für die Berechnung des Permeabilitätskoeffizient für $CO_2$ ( $PCO_2$ ) . . . . .	106
9	Quantenausbeute Photosystem II ( $PS_{II}$ ) . . . . .	110
10	Elektronentransportrate (ETR) . . . . .	111
11	Assimilationsrate (A) . . . . .	112
12	Mitscherlich Gleichung . . . . .	113

# Anhang

## Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ad	Addition, Auffüllen mit bzw. auf Volumen
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
AS-Sequenz	Aminosäuresequenz
$A_{\max}$	maximale, lichtgesättigte Photosyntheserate
$A_N$	Netto-Assimilationsrate
$A_{qe}$	linearer Anstieg der Photosynthese-Rate
Bp	Basenpaare
ca.	circa, zirka
$C_a$	CO <sub>2</sub> -Konzentration im Außenmedium
dt.	deutsch für
eng.	englisch für
ETR	Elektronentransportrate
FDA	Fluoreszeindiacetat
h	“hora”, Stunde
k	Konstante der Reaktionskinetik
LCP	Lichtkompensationspunkt
min	Minute
ml	Milliliter
m	meter
mM	Millimolar , $10^{-3} \text{ g}^*\text{mol}^{-1}$
M	Molar, $\text{g}^*\text{mol}^{-1}$
ms	Millisekunde
$\mu\text{s}$	Mikrosekunde
nm	Nanometer
Nt	Nukleotide
$P_{\text{CO}_2}$	Permeabilitätskoeffizient für CO <sub>2</sub>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Temp.	Temperatur
Vol.	Volumeneinheit
x g	x-fache Schwerebeschleunigung, ca. $9,8 \text{ m}^*\text{s}^{-2}$

## Abkürzungen englischsprachiger Begriffe

Abkürzung	Englische Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung
C3	C3 carbon fixation	C3 Kohlenstofffixierung
C4	C4 carbon fixation	C4 Kohlenstofffixierung
CCP	CO <sub>2</sub> compensation point	CO <sub>2</sub> -Kompensationspunkt
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	komplementäre DNS
DIG	Digoxigenin	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	Boten-RNS
PAR	Photosynthetically Active Radiation	photosynthetisch aktive Strahlung
PFD	Photon Flux Density	Photonenstromdichte
psi	pound per square inch	Pfund pro Quadrat Zoll
P <sub>CO<sub>2</sub></sub>	CO <sub>2</sub> permeability coefficient	Permeabilitätskoeffizient für CO <sub>2</sub>
P <sub>f</sub>	osmotic water permeability coefficient	Osmotischer Wasserpermeabilitätskoeffizient
RNAi	RNA interference	RNS-Interferenz
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
T-DNA	transfer-DNA	Transfer-DNS
T <sub>m</sub>	temperature of melting	Schmelztemperatur der Primer
TRV	tobacco rattle virus	“Tobacco rattle virus”
VIGS	virus induced gene silencing	Virus induzierte Genminderung
v/v	volume per volume	Volumenprozent
w/v	weight per volume	Massenprozent bezogen auf das Volumen

## Verwendete PCR Primer

Primer	Sequenz	Bemerkung
CgPDS_1_as	5' - ATAAACCTTTGTTGCTCGAAGC-AAGA - 3'	zur Amplifikation aus cDNS
CgPDS_1_s	5' - TCTTTCAAGTTCTTTCATCGTGG-CTT- 3'	zur Amplifikation aus cDNS
CsPDS_1_as	5' - ATAAACCTTTGTTGCTCGAAG-CAAGA - 3'	zur Amplifikation aus cDNS
CgPDS_1_s	5' - CTTTCAAGTTCTTTCATCGTGGC-TT - 3'	zur Amplifikation aus cDNS
CgPDS_2_s	5' - TTGAAAACACTGTAAATTTCTTG-GAAGCCG - 3'	zur Klonierung in pTRV2
CgPDS_2_as	5' - TGGCTTCTATGATATCGGAATCA-CTGCG - 3'	zur Klonierung in pTRV2
M13_as	5' - GAAACAGCTATGACCATGATTAC-GCC - 3'	zur Sequenzierung aus pDrive
M13_s	5' - GACGTTGTAAAACGACGGCCA-G - 3'	zur Sequenzierung aus pDrive
TRV1_s	5' - TTACAGGTTATTTGGGCTAG - 3'	zum Nachweis von TRV1
TRV1_as	5' - CCGGGTTCAATTCCTTATC - 3'	zum Nachweis von TRV1

## DNS-Sequenzen

```
ttctttcaagttctttcatcgtggcttctatgatatcggaatcactgcgtgagatccattctgccgcaggcgca  
aaaaccaattccagcatcgatcgattgggatcgtaatatctttacaagttaacgacatgtcagcgtatacact  
cagaagtgcacttctgctaaaagtaggtgatcatatgtgttcttcagttttctgtcaaaccatatatgaacat  
taataaccggcactccaactaatttctccaatcttccaaaatatggtatttctttccaagtatccggtacaagg  
agcttttaggatataactataggaaaatgtcgagagctatttagagcaagcagatatttaagatgaaattcaatt  
ttcgtaaaaggggctagaaatagacctggagtagcaaacacataggcatctccttcaatagtgggtccatcac  
tgagtacgaaattcttaaccgtcccatcgttatcgagttcgattttcttaattctagaatttaatcgtacttcc  
ccacctagtgcacttaatgtgatccacgatgggcttacagagtctctctgggggggtaccatccaagaatgccat  
cttagaaccgtgtttttctggagaaaacggttcaaggctatcaatatgcattgcattggatagttcttctggat  
ttataaagtttaatgcctttgacatggcaatgaatacttcatcagtaacacgcttcggtactccctgcttctcc  
gtccattcttttaactgatagcccatcttgagcttcaacataagcctgcccaccaaccatagcgggtaaaagtcc  
aatagcaaacttcactttctccggccacgttaacatttcattgtttcttaaaatagcccaaataccgtttaagg  
gtgctggtaggacttctgggaaatcaaactactaaattctccagggtttatttggcatagcaaatatcatggaa  
tggttccttccactgtaatcgatcattgattccaagttctccaaacaagttctgcacatttggataggcaccaaa  
gaatatatgtaaacctgtttcataccaatccccatcttcatctttccatgcagctaccttcccaccaagaacat  
ctcttgcttcgagcaacaaaggtttat
```

Abbildung (5.4) Teil-Sequenz CgPDS, sequenziert aus TA-Klon

```
tctttcaagttctttcatcgtggcttcaatgatatacagagtcgctgcgcgagatccattctgccgccggagcaa  
aaaccaattccagcatcgaccggttgggatcgtaatatctttacaagctaacggcatatcagcgtatacactc  
aagagggcacttctgctaaaaagtaggtgatcatatgtgttcttcagttttctgtcaaaccatatatgaacatt  
aataaccggaactccaactaacttctccaacccccctgaagtatgataattctttccaggatatccggcaaaagga  
gcttcaggatatcaactggagttgcaaacacgtaggcgtcaccttcgatattggctccatcactgagtacaaaa  
ctcttaactgtcctgtctttattgagctcgattttctttattctagaatttagtcgtacttccccacctaataga  
ccgaatgtgatccacaatgggcatgcagagcctctccgggggggtaccatccaaaaatgccatcttggaaaccgt  
gtttttcttgaagaaacctgttcaaggctatcaatatgcattgcattgatagttcttcgggatttataaagttt  
aatgcctttgacattgcaatgaatacttcatcagtcacacgctcgggtacgccctgtttttccatccattcttt  
aactgatagaccatcttgagcctcaacatagcctgcccaccaaccatagccggtagaagtccaatagcaaact  
tcactttctccggccacgttaacatttcattgtttcttaaaatggcccatataaccgtttaagggtctgggtagg  
acttcagggaatcaaactactaaattctccgggtttatttggcatagcaaatatcatggaatgctccttcca  
ctgtaaccgatcattgattccgagttctccaaacaagttctgcacatttggataggcaccaagaatatatgta  
atcctgtctcataccagttctccatcttcatcttgccatgcagctaccttcccaccaagaacatctcttgcttcg  
agcaacaaaggtttat
```

Abbildung (5.5) Teil-Sequenz CsPDS, sequenziert aus TA-Klon

## Verwendete Programme

Verwendetes Programm	Quelle	Versions Nummer
ClustalX	<a href="http://www.clustal.org">www.clustal.org</a>	2.1
fastqc	<a href="http://bioinformatics.bbsrc.ac.uk">bioinformatics.bbsrc.ac.uk</a>	
fastq-dump	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	
fastq_to_fasta	<a href="http://hannonlab.cshl.edu">hannonlab.cshl.edu</a>	
fastx toolkit	<a href="http://hannonlab.cshl.edu">hannonlab.cshl.edu</a>	0.0.13
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov">rsbweb.nih.gov</a>	1.47a
LAlign	<a href="http://embnet.vital-it.ch">embnet.vital-it.ch</a>	35
ncbi-blast-2.2.25+	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>	2.2.25+
pdfTeX	<a href="http://pdfTeX.git.sourceforge.net">pdfTeX.git.sourceforge.net</a>	3.1415926-2.4-1.40.13
PyMol	<a href="http://www.pymol.org">www.pymol.org</a>	1.5.0.1-2build1
R	<a href="http://www.r-project.org">www.r-project.org</a>	2.15.1
SOSUI	<a href="http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp">bp.nuap.nagoya-u.ac.jp</a>	1.11
SRA Toolkit	<a href="http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov">eutils.ncbi.nlm.nih.gov</a>	2.3.2-5
SWISS-MODEL	<a href="http://swissmodel.expasy.org">swissmodel.expasy.org</a>	
Trinity	<a href="http://trinityrnaseq.sourceforge.net">trinityrnaseq.sourceforge.net</a>	r2011-08-20
WinControl	<a href="http://www.walz.com">www.walz.com</a>	3.22

# Danksagung

Prof. Gerhard Thiel,  
Prof. Heribert Warzecha,  
Prof. Uwe Ludewig,  
Prof. Adam Bertl,  
Dr. Marlies Heckwolf,  
Ramon Gebert,  
Magdalena Lachnit,  
Dr. Michael Seidl,  
Dr. Jan Rehker,  
Dr. Sven Heckwolf,  
Christian Vogt,

alle die mich einen Teil meines Weges begleitet habe, von denen ich etwas lernen konnte, die mich inspiriert und unterstützt haben.

Danke.

# Publikationen und Vorträge

## Publikationen

Uehlein N., Sperling H., Heckwolf M., Kaldenhoff R.  
*The Arabidopsis aquaporin PIP1;2 rules cellular CO<sub>2</sub> uptake*  
Plant Cell Environ 35: 1077-1083; (2012)

## Konferenzen

13.-14. März 2011  
DFG Priority Program Adaptomics 1529:  
*Evolutionary plant solutions to ecological challenges: Molecular mechanisms underlying adaptive traits in the Brassicaceae*  
Vortrag Henrik Sperling:  
*Aquaporins as key components in C<sub>4</sub> photosynthesis*



# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name	Henrik Sperling
Geburtsdatum	15.02.1976
Geburtsort	Ulm
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## Ausbildung

- **1996**  
Allgemeinen Hochschulreife HANS UND SOPHIE SCHOLL-GYMNASIUM in Ulm.
- **1996-1997**  
Zivildienst ARBEITERWOHLFAHRT KV ULM in Ulm.
- **1997-2003**  
Studium der Rechtswissenschaften JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT in Würzburg mit Abschluss: Erstes juristisches Staatsexamen.
- **1999-2001**  
Studium Wirtschaftschinesisch JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT in Würzburg mit Abschluss.
- **2003-2009**  
Studium der Biologie TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT in Darmstadt.
- **2008 - 2009**  
Diplomarbeit Biologie TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT in Darmstadt.  
*Funktionelle Analyse von Aquaporinen in Nicotiana tabacum.*  
bei Professor Ralf Kaldenhoff am Institut für Botanik.
- **2009 - 2012**  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter TECHNISCHE UNIVERSITÄT DARMSTADT in Darmstadt bei Professor Ralf Kaldenhoff am Institut für Botanik.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Frankfurt, 26. März 2014

.....

